

Der Einfluss des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen des Stäbchenaußen- segmentes auf die ersten Schritte der visuellen Signaltransduktion

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biophysikerin Katja Waterstradt

geboren am 31.10.1974 in Suhl

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Klaus-Peter Hofmann

2. Prof. Dr. Andreas Herrmann

3. Prof. Dr. Heiko Heerklotz

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2009

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung einer großen Anzahl von Menschen, denen ich meinen Dank aussprechen möchte.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Hofmann am Institut für Med. Physik und Biophysik (IMPB) der Charite, Berlin, durchgeführt. Ich möchte ihm für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit in dieser Arbeitsgruppe anfertigen konnte. Seine Diskussionen und Anregungen waren stets eine Bereicherung und förderten meinen Blick auf größere Zusammenhänge.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elke Hessel für die Betreuung dieser Arbeit und für ihre Unterstützung und Anregungen bei der Anfertigung des Manuskriptes.

Ich danke allen anderen Mitgliedern des Institutes für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Kerstin Zimmermann, Sebastian Rausch und Eglof Ritter.

Besonderen Dank gebührt Dr. Martin Heck für seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, besonders in Fragen der Kinetik, ebenso wie Dr. Pulvermüller.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Ingrid Semjonow für ihre freundliche Unterstützung im Labor bedanken. Und auch bei Jana Engelmann, Helena Seidel, Christine Koch und Anja Koch bedanke ich mich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Neumann, Frau Wittling und Frau Raddatz, die mir in organisatorischen Dingen immer sehr behilflich waren.

Herrn Prof. Herrmann und Dr. Peter Müller danke ich für die Diskussionsbereitschaft in allen Fragen der Elektronenspinresonanz.

Herrn Prof. Heerklotz und Dr. Sandro Keller danke ich für die Einführung in das spannende Gebiet der Isothermen Titrationskalorimetrie.

Zusammenfassung

Das Außensegment der Stäbchenzelle ist aus einem Stapel von flachen Membransäckchen, den Diskmembranen, aufgebaut. Entlang dessen existiert ein Cholesterolgradient mit 24 mol% Cholesterol in den basalen Diskmembranen und 5 mol% in den apikalen. Das Außensegment enthält alle Proteine der Signaltransduktion. Der Photorezeptor Rhodopsin ist als integrales Membranprotein in die Diskmembran eingebettet. Das G-Protein Transducin und das Effektorprotein, die Phosphodiesterase (PDE), sind periphere Proteine mit Lipidankern und somit reversibel mit der Membranoberfläche assoziiert. Um den Einfluss des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen auf diese drei Proteine zu untersuchen, wurden Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt präpariert (Simulation des Cholesterolgradienten). Die Untersuchungen zur transversalen Verteilung des Cholesterols in der Diskmembran ergaben eine schnelle Transmembranbewegung mit einer Halbwertszeit von weniger als einer Minute bei 35 °C. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass es zu kopfgruppenspezifischen Wechselwirkungen von Cholesterol mit dem Phospholipid Phosphatidylcholin kommt. Cholesterol verschiebt das Meta I-Meta II-Gleichgewicht (nach Lichtaktivierung von Rhodopsin) auf die Seite von Meta I (inaktiv). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit des Transducins das Gleichgewicht vollständig auf die Seite von Meta II (aktiv) verschoben wird, da Transducin spezifisch die Meta-II-Form stabilisiert. Somit kann die verminderte Meta II-Bildung des Rezeptors in Diskmembranen mit hohem Cholesterolgehalt durch Transducin ausgeglichen werden. Lediglich die Geschwindigkeit der Transducinaktivierung ist verlangsamt. Durch den erhöhten Cholesterolgehalt werden die Membraneigenschaften für eine Bindung der beiden peripheren Proteine Transducin und PDE über deren Lipidanker optimiert. Somit kann die Signaltransduktion auch in den basalen Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes stattfinden.

Schlüsselwörter:

Cholesterol, Diskmembranen, Signaltransduktion, Lipid-Protein-Wechselwirkung, Stäbchenaußensegment, Transducin, Rhodopsin

Abstract

The rod outer segment consists of a stack of flat membrane saccules called disc membranes. Along this stack a cholesterol gradient exists with 24 mol% cholesterol in the basal and only 5 mol% in the apical disc membranes. The outer segment contains all the proteins necessary for signal transduction. The photoreceptor rhodopsin as integral membrane protein is embedded in the disc membrane. The G protein transducin and the effector protein phosphodiesterase (PDE) are soluble proteins with lipid modifications, which are associated reversibly to the membrane surface. Disc membranes with different cholesterol contents were prepared to simulate the cholesterol gradient along the rod outer segment and to investigate the influence of disc membrane cholesterol content of these three proteins. Investigations of the transversal distribution of cholesterol in the disc membrane revealed a fast transmembrane movement with a half life of less than one minute at 35 °C. Further, head group specific interactions between cholesterol and phosphatidylcholine could be shown. The Meta I Meta II equilibrium after light activation of rhodopsin was shifted to the Meta I (inactive) site in membranes with high cholesterol. In this work it was shown that in the presence of transducin this equilibrium is shifted completely to the Meta II (active) site because transducin stabilizes specifically the Meta II form of the receptor. Hence the reduced Meta II formation in disc membranes with high cholesterol could be compensated by transducin. The speed of transducin activation is decelerated. By the increased cholesterol content membrane properties are optimized to the binding of transducin and PDE via their lipid modifications. Thus the signal transduction can take place also in disc membranes with high cholesterol.

Keywords:

cholesterol, disc membrane, signal transduction, protein lipid interaction, rod outer segment, transducin , rhodopsin

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
ABSTRACT.....	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOMEMBRANEN.....	1
1.1.1 Phospholipide	2
1.1.2 Cholesterol.....	4
1.1.3 Die Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes	6
1.2 DIE SIGNALTRANSDUKTION.....	9
1.2.1 Die visuelle Signaltransduktion	10
1.2.2 Rhodopsin	12
1.2.3 Transducin	16
1.2.4 Phosphodiesterase	17
1.3 ZIELE DIESER ARBEIT	18
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	20
2.1 PRÄPARATIONEN	20
2.1.1 Präparation von Stäbchenaußensegmenten (<i>rod outer segment</i> , ROS).....	20
2.1.2 Präparation von Diskvesikeln	20
2.1.3 Isolation von Phosphodiesterase und Transducin aus ROS	21
2.1.3.1 Aufreinigung der PDE	22
2.1.3.2 Auftrennung der Transducin-Untereinheiten	23
2.1.4 Präparation unilamellarer Vesikel.....	23
2.2 AUFTRENNUNG DER NATIVEN DISKMEMBRANEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT MITTELS DICHTEZENTRIFUGATION.....	24
2.3 MODIFIKATION DES CHOLESTEROLGEHALTES VON DISKMEMBRANEN	24
2.3.1 Herstellung von Cholesterol-Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen	24
2.3.2 Beladung mit bzw. Entzug von Cholesterol.....	25
2.4 ANALYTISCHE BESTIMMUNG DER LIPIDE	26
2.4.1 Lipidextraktion.....	26

2.4.2	Phosphatbestimmung	26
2.4.3	Cholesterolbestimmung	27
2.5	KALORIMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG VON DISKMEMBRANEN MIT VERÄNDERTEM CHOLESTEROLGEHALT	27
2.6	ELEKTRONENSPINRESONANZ	28
2.6.1	Theoretische Grundlagen	28
2.6.2	Ascorbat-Reduktionsmethode	31
2.6.2.1	Einbau von spinmarkierten Cholesterolanaloga in Diskmembranen	31
2.6.2.2	Reduktion der Cholesterolspinsonden - ESR-Messung	32
2.6.2.3	Unilamellare POPC-Vesikel mit spinmarkierten Lipiden	32
2.6.3	BSA-Extraktionsmethode	33
2.6.3.1	Extraktion von spinmarkierten Phospholipiden durch BSA aus Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt	33
2.6.3.2	Einfluss der Phosphodiesterase auf die Extrahierbarkeit der Phospholipidanaloga	34
2.6.3.3	Quantitative Analyse der ESR-Spektren nach BSA-Extraktion	34
2.6.4	Analyse der Bewegungsparameter der ESR-Spektren	35
2.7	UV/VIS-SPEKTROSKOPIE ZUR BESTIMMUNG VON RHODOPSIN UND SEINEN PHOTOINTERMEDIATEN	36
2.7.1	Konzentrationsbestimmung von Rhodopsin	36
2.7.2	Bestimmung des Meta II-Anteils in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt	36
2.8	DUNKELBINDUNG VON TRANSDUCIN BZW. PDE AN DISK-MEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	37
2.8.1	Zentrifugationsexperiment	37
2.8.2	Quantifizierung der Dunkelbindung von Transducin und Phosphodiesterase	38
2.9	ZEITAUFGELÖSTE LICHTSTREUUNG	38
2.9.1	Messung des Bindungssignals	39
2.9.2	Messung des Dissoziationssignals	39
2.10	MESSUNG DER PDE-AKTIVITÄT	40
2.11	MATERIALIEN	40
2.11.1	Verwendete Chemikalien	41
2.11.2	Zusammensetzung der Puffer	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	VERTEILUNG UND BEWEGLICHKEIT VON CHOLESTEROL IN DISKMEMBRANEN	43
3.1.1	Ascorbatreduktion von verschiedenen spinmarkierten Cholesterolanaloga	43
3.1.2	Reduktion der verschiedenen Cholesterolanaloga mit 6-O-Phenylascorbat	46
3.1.3	Temperaturabhängige Ascorbatreduktion von SL-Cholestan in Diskmembranen	48
3.1.4	Ascorbatreduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Spinsonde	51
3.1.5	Vergleich der Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen und symmetrisch markierten POPC-Vesikeln	52
3.1.6	Vergleich der ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln	57

3.2	DICHTEZENTRIFUGATION NATIVER DISKMEMBRANEN	58
3.3	MODIFIKATION DES CHOLESTEROLGEHALTES VON DISKMEMBRANEN	59
3.4	KALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNG VON DISKMEMBRANEN NACH CHOLESTEROLENTZUG BZW. –BELADUNG	62
3.5	EXTRAHIERBARKEIT SPINMAKIERTER PHOSPHOLIPIDE DURCH BSA AUS DISKMEMBRANEN MIT VERÄNDERTEM CHOLESTEROLGEHALT	64
3.6	EINFLUSS DES CHOLESTEROLGEHALTES AUF DIE AKTIVE REZEPTORKONFORMATION	69
3.6.1	Meta II-Bildung	69
3.6.2	Meta II-Bildung in Anwesenheit von Transducin	73
3.7	WECHSELWIRKUNGEN VON TRANSDUCIN MIT DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	74
3.7.1	Dunkelbindung von Transducin an Diskmembranen	74
3.7.2	Geschwindigkeit der Transducinaktivierung in Diskmembranen	77
3.8	WECHSELWIRKUNGEN DER PDE MIT DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	79
3.8.1	Membranbindung der PDE	79
3.8.2	Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga	81
3.8.3	Einfluss des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen auf die Aktivität der PDE	84
4	DISKUSSION	87
4.1	DIE VERTEILUNG UND BEWEGLICHKEIT VON CHOLESTEROL IN DISKMEMBRANEN	87
4.1.1	Die unterschiedlichen Cholesterolanaloga	87
4.1.2	Beschreibt die langsame Reduktionskomponente die Transmembranbewegung von SL- Cholestan?	90
4.1.3	Was beschreibt die langsame Reduktionskomponente?	92
4.2	DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	95
4.3	WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN CHOLESTEROL UND DEN PHOSPHOLIPIDEN DER DISKMEMBRANEN	96
4.4	EINFLUSS DES CHOLESTEROLGEHALTES DER DISKMEMBRANEN AUF DIE AKTIVIERUNG VON RHODOPSIN	99
4.5	INTERAKTIONEN ZWISCHEN CHOLESTEROL UND TRANSDUCIN	100
4.5.1	Einfluss von Transducin auf das Meta I-Meta II-Gleichgewicht	100
4.5.2	Membranbindung von Transducin	101
4.5.3	Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Transducinaktivierung	105
4.6	INTERAKTIONEN ZWISCHEN CHOLESTEROL UND DER PDE	106
4.6.1	Membranbindung der PDE	106
4.6.2	Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga	107
4.6.3	Abhängigkeit der Aktivität der PDE vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen	108
4.7	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DES CHOLESTEROLGRADIENTEN ENTLANG DES STÄBCHENAÜBENSEGMENTES	109
4.8	AUSBLICK	115

LITERATURVERZEICHNIS.....	117
PUBLIKATIONEN.....	133
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	134

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: FLÜSSIG-MOSAIK-MODELL EINER BIOMEMBRAN VON SINGER UND NICOLSON (1972)	1
ABBILDUNG 2: STRUKTUR DER DOCOSAHEXAENSÄURE (DHA, 22:6 ω-3).....	3
ABBILDUNG 3: STRUKTUR DES CHOLESTEROL.....	4
ABBILDUNG 4: VERSCHIEDENE PHASEN IN MEMBRANEN	5
ABBILDUNG 5: BILDUNG NEUER DISKVESIKEL	7
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER MEMBRAN MIT EINER PROTEINDICHTE VON 30000 μM^{-2}	9
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VISUELLEN SIGNALTRANSDUKTION - AKTIVIERUNG UND DEAKTIVIERUNG.....	11
ABBILDUNG 8: RHODOPSINSTRUKTUR MIT REGIONEN BEVORZUGTER WECHSELWIRKUNG MIT LIPIDEN.....	15
ABBILDUNG 9: STRUKTUR VON 2,6-DI-O-METHYL- β -CYCLODEXTRIN (M β CD)	25
ABBILDUNG 10: ZEEMAN-EFFEKT	29
ABBILDUNG 11: HYPERFEINAUFSPALTUNG DER ENERGIELEVELS UND DAS DAZUGEHÖRIGE ESR- SIGNAL	30
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER CHEMISCHEN STRUKTUR VON NATIVEM CHOLESTEROL MIT DEN SPINMARKIERTEN STEROLANALOGA	31
ABBILDUNG 13: CHEMISCHE STRUKTUR DER SPINMARKIERTEN PHOSPHOLIPIDANALOGA (SL-PL)	33
ABBILDUNG 14: ESR-SPEKTREN DER ASKORBATREDUKTION VON SL-C IN DISKMEMBRANEN.....	44
ABBILDUNG 15: ASKORBATREDUKTION VON SPINMARKIERTEN CHOLESTEROLANALOGA IN DISKMEMBRANEN	45
ABBILDUNG 16: 6-O-PHENYLASKORBATREDUKTION VON SPINMARKIERTEN CHOLESTEROLANALOGA IN DISKMEMBRANEN	47
ABBILDUNG 17: TEMPERATURABHÄNGIGE ASKORBATREDUKTION VON SPINMARKIERTEM CHOLESTAN IN DISKMEMBRANEN	49
ABBILDUNG 18: ARRHENIUSPLOT DER REAKTIONSGESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN DER ASKORBATREDUKTION VON SL-C IN DISKMEMBRANEN	51
ABBILDUNG 19: EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT AUF DIE ASKORBATREDUKTION VON SL-C IN DISKMEMBRANEN	52
ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER ASKORBATREDUKTION VON SL-C UND SPINMARKIERTEM PHOSPHATIDYLCHOLIN (SL-PC) IN POPC-VESIKELN	54
ABBILDUNG 21: VERGLEICH DER REDUKTIONSVERLÄUFE VON SL-C IN DISKMEMBRANEN UND POPC VESIKELN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN	56
ABBILDUNG 22: TEMPERATURABHÄNGIGE ESR-SPEKTREN VON SL-C IN DISKMEMBRANEN UND POPC- VESIKELN	57
ABBILDUNG 23: ESR-PARAMETER VON SL-C IN DISKMEMBRANEN UND POPC-VESIKELN.....	58
ABBILDUNG 24: DICHTENZENTRIFUGATION VON DISKMEMBRANEN NACH DIGITONINBELADUNG	59
ABBILDUNG 25: MODIFIKATION DES CHOLESTEROLGHALTES VON DISKMEMBRANEN	61
ABBILDUNG 26: KALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER DISKMEMBRANEN	63
ABBILDUNG 27: THERMODYNAMISCHE PARAMETER DER ITC MESSUNGEN.....	64

ABBILDUNG 28: BSA-EXTRAKTION VON SL-PL AUS DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	66
ABBILDUNG 29: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN EXTRAHIERBARKEIT UND CHOLESTEROLGEHALT	67
ABBILDUNG 30: SPEKTRENVERGLEICH VON SL-PC IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT	68
ABBILDUNG 31: META II-BILDUNG IN DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	69
ABBILDUNG 32: META II-BILDUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT.....	70
ABBILDUNG 33: ZEITVERLAUF DER META II-BILDUNG IN DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	71
ABBILDUNG 34: <i>EXTRA META II</i> IN DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	73
ABBILDUNG 35: LICHTSTREUSIGNALE VON DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	75
ABBILDUNG 36: MEMBRANBINDUNG VON TRANSDUCIN – BERECHNET AUS DEN LICHTSTREUMESSUNGEN	76
ABBILDUNG 37: MEMBRANBINDUNG VON TRANSDUCIN – ZENTRIFUGATIONSEXPERIMENT	77
ABBILDUNG 38: VERGLEICH DER GESCHWINDIGKEITEN DER DISSOZIATIONSSIGNALE IN DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	78
ABBILDUNG 39: GESCHWINDIGKEITEN DER LICHTSTREUSIGNALE.....	79
ABBILDUNG 40: MEMBRANBINDUNG DER PDE:	80
ABBILDUNG 41: EINFLUSS DER PDE AUF DIE EXTRAHIERBARKEIT VON SL-PC DURCH BSA	81
ABBILDUNG 42: EINFLUSS DER PDE AUF DIE EXTRAHIERBARKEIT VON SL-PC DURCH BSA IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT DER DISKMEMBRANEN	82
ABBILDUNG 43: EINFLUSS DER PDE AUF DIE EXTRAHIERBARKEIT VON SL-PE DURCH BSA IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT DER DISKMEMBRANEN	83
ABBILDUNG 44: MESSUNG DER PDE-AKTIVITÄT IN DISKMEMBRANEN MIT UNTERSCHIEDLICHEM CHOLESTEROLGEHALT	86
ABBILDUNG 45: RELATIVE PDE-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM CHOLESTEROLGEHALT DER DISKMEMBRANEN	86
ABBILDUNG 46: TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER TRANSDUCINMEMBRANBINDUNG.....	103
ABBILDUNG 47: MODELL ZUR ROLLE DES CHOLESTEROLS IN DER VISUELLEN SIGNALTRANSDUKTION	113

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	PARAMETER DER BIEXPONENTIELLEN FUNKTIONEN DER ASKORBATREDUKTION VON CHOLESTEROLANALOGA IN DISKMEMBRANEN	46
TABELLE 2:	PARAMETER DER BIEXPONENTIELLEN FUNKTIONEN DER 6-O- PENYLASKORBATREDUKTION VON CHOLESTEROLANALOGA IN DISKMEMBRANEN	48
TABELLE 3:	PARAMETER DER BIEXPONENTIELLEN FUNKTIONEN DER TEMPERATURABHÄNGIGEN ASKORBATREDUKTION VON SL-C IN DISKMEMBRANEN	50
TABELLE 4:	PARAMETER DER BIEXPONENTIELLEN FUNKTIONEN DER ASKORBATREDUKTION VON SL-C IN DISKMEMBRANEN UND POPC-VESIKELN	55
TABELLE 5:	EINFLUSS DES CHOLESTEROLGEHALTES AUF DIE ANTEILE DER NICHTEXTRAHIERBAREN SL-PL	67
TABELLE 6:	PARAMETER DES META I-META II-GLEICHGEWICHES	72
TABELLE 7:	EXTRAKTIONSUNTERSCHIEDE VON SL-PC UND SL-PE NACH ZUGABE VON PDE	84

Abkürzungsverzeichnis

ABCA4	<i>ATP-binding cassette transporter</i> , Unterfamilie A4
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cGMP	<i>cyclic Guanosinmonophosphate</i>
CHO-K1	chinese hamster ovary K1 Zellen
DHA	Docosahexaensäure
DOPC	Di-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
DPPC	Di-Palmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
Ei-PC	Phosphatidylcholin aus Eigelb
ESR	Elektronenspinresonanz
GC	Guanylylzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
Gt	Transducin
GTP	Guanosintriphosphat
G α	α -Untereinheit von Transducin
G β 5	Typ 5 G-Protein β -Untereinheit
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit von Transducin
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicle</i>)
MDCK	Epithelzellen der Hundeniere (<i>Madin-Darby canine kidney</i>)
M β CD	2,6-Di-O-Methyl- β -Cyclodextrin
PDE	Phosphodiesterase
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
R9AP	<i>RGS9-1 anchor protein</i>
randM β CD	zufällig methyliertes β -Cyclodextrin (<i>randomly methylated β-cyclodextrin</i>)
RGS9-1	<i>regulator of G protein signaling</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL-A	spinmarkiertes Androstan
SL-C	spinmarkiertes Cholestan
SL-Chol	spinmarkiertes Cholesterol
SL-PC	spinmarkiertes Phosphatidylcholin
SL-PE	spinmarkiertes Phosphatidylethanolamin
SL-PL	spinmarkierte Phospholipide
SL-PS	spinmarkiertes Phosphatidylserin
T	absolute Temperatur in Kelvin
UV/Vis	ultravioletter und sichtbarer Bereich der elektromagnetischen Strahlung
ΔG	Änderung der freien Enthalpie
ΔH	Änderung der Reaktionsenthalpie
ΔS	Änderung der Entropie

1 Einleitung

1.1 Biomembranen

Die lebende Zelle ist von ihrer Umgebung durch eine Schicht von Molekülen (Membran) physikalisch getrennt. Die Plasmamembran legt eine Außengrenze von Zellen fest und regelt den Austausch von Molekülen über diese Grenze. Ferner können Biomembranen auch den Innenraum der Zelle in Kompartimente unterteilen, wodurch Prozesse und Zellbestandteile voneinander getrennt werden, z.B. Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Komplex und das Endoplasmatische Retikulum. Die Hauptbestandteile einer Biomembran sind Lipide und Proteine. Sie ist aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut, deren Organisation von Singer und Nicolson 1972 in dem Flüssig-Mosaik-Modell beschrieben wurde (Abbildung 1:). Darin sind die hydrophoben Anteile der beiden Lipidschichten zueinander angeordnet, so dass sie durch die hydrophilen Anteile von der wässrigen Umgebung abgeschirmt sind. Sowohl die Lipide als auch die Proteine können lateral in der Membran diffundieren. Die Lipide lassen sich in mehrere Gruppen unterteilen, die Phospholipide, Sphingolipide, Glykolipide und Sterole. Im Rahmen dieser Arbeit sind die Phospholipide und das Cholesterol von besonderer Bedeutung und werden im Folgenden näher erläutert.

Die Proteine können als periphere Proteine auf der Membran aufliegen oder als integrale Proteine die Membran teilweise bzw. vollständig durchspannen. Für diese Arbeit relevante Proteine sind zum einen das Rhodopsin als integrales Protein und zum anderen das Transducin und die Phosphodiesterase als periphere Proteine. Auf sie wird in den Kapiteln zur visuellen Signaltransduktion näher eingegangen werden.

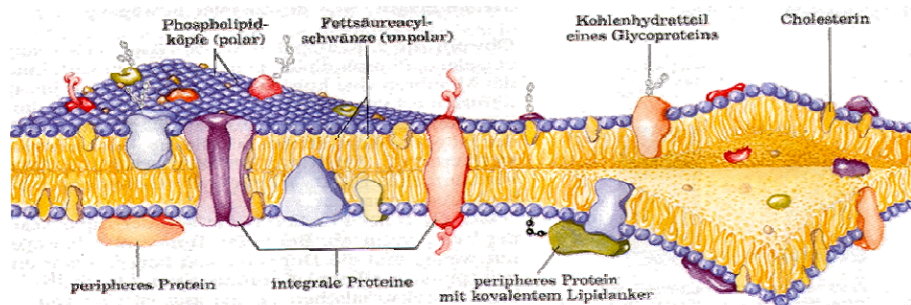


Abbildung 1: Flüssig-Mosaik-Modell einer Biomembran von Singer und Nicolson (1972)

Grafik entnommen aus: Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. und Cox, M.M. (2001) in *Prinzipien der Biochemie*, Seite 315

1.1.1 Phospholipide

In eukaryotischen Membranen bilden die Phospholipide den Hauptbestandteil der Lipiddoppelschicht. Man unterscheidet die Glycerophospholipide und die Phosphosphingolipide. Im Folgenden werden jedoch nur die Glycerophospholipide erläutert, da sie für das Verständnis dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind (zur Vereinfachung wird für sie im Folgenden der Begriff Phospholipide gebraucht).

Die Phospholipide bestehen aus einem Glyceringerüst dessen erstes und zweites Kohlenstoffatom mit je einer Fettsäure verestert ist. Am dritten Kohlenstoff befindet sich die polare Kopfgruppe, bestehend aus einem Phosphosäurediester und einer funktionellen Gruppe. Die häufigsten funktionellen Gruppen sind Cholin, Ethanolamin und Serin. Durch die polare Kopfgruppe und die hydrophoben Fettsäuren erhält das Molekül einen amphiphilen Charakter. Diese Eigenschaft führt dazu, dass sie sich in wässrigen Lösungen spontan zusammenlagern, um die hydrophoben Anteile vom Wasser abzuschirmen. Dieser Prozess ist entropiegetrieben (Tanford, 1973). Welche Gestalt diese Zusammenlagerungen haben, hängt von dem Größenverhältnis der Kopfgruppenfläche zum Querschnitt der Fettsäuren ab. Zylindrische Phospholipide wie das Phosphatidylcholin, bei denen die Kopfgruppe die gleiche Fläche beansprucht wie die beiden Fettsäureketten, bilden planare Lipiddoppelschichten. Phosphatidylethanolamin dagegen hat eine konische Form, wobei die Kopfgruppe eine geringere Fläche einnimmt als die Fettsäuren. Es bildet daher hexagonale Strukturen. Phospholipide mit nur einer Fettsäure bzw. einer langen und einer kurzen, so genannte Lysolipide, bilden bevorzugt Mizellen, da die Kopfgruppe eine größere Fläche beansprucht als der Fettsäurebereich.

Die Fettsäuren sind unverzweigte Kohlenwasserstoffketten, die in ihrer Länge und der Anzahl der Doppelbindungen variieren können. Fettsäuren ohne Doppelbindung werden als gesättigt, solche mit Doppelbindungen als ungesättigt bezeichnet. Die Kombination verschiedenster Fettsäuren mit unterschiedlichen Kopfgruppen führt zu einer großen strukturellen Variabilität der Phospholipide. Diese Variabilität hat großen Einfluss auf die Eigenschaften der jeweiligen Membran. Je nach Lipidzusammensetzung können sich die Membranen sehr stark in ihrer Dicke, Permeabilität, Fluidität u.v.m. unterscheiden. Somit ist die Lipidzusammensetzung der jeweiligen Funktion der Membran angepasst. Beispielsweise unterscheiden sich die Plasmamembran und die Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes stark in ihrer Lipidzusammensetzung. Erstere stellt eine äußere Grenze der Zelle dar, die mit Hilfe von Ionenkanälen unterschiedliche Membranpotentiale besitzen kann. Letztere beherbergen die Proteine der

Signaltransduktion und sind auf die optimale Funktion dieser Signalkaskade angepasst (1.1.3).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren spielen in der visuellen Signaltransduktion eine besondere Rolle. Die häufigste Fettsäure der Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes (1.1.3) ist die Docosahexaensäure (DHA) (Stinson et al., 1991). Sie besteht aus einer Kette von 22 Kohlenstoffatomen und besitzt sechs Doppelbindungen (Abbildung 2). Sie gehört zur Familie der Omega-3-Fettsäuren, welche nach der Position der letzten Doppelbindung benannt wurde.

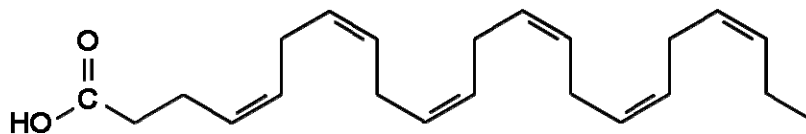


Abbildung 2: Struktur der Docosahexaensäure (DHA, 22:6 ω-3)

Anders als aufgrund der Anzahl der Kohlenstoffatome zu erwarten, sind Membranen mit hohem DHA-Anteil nicht dicker. Membranen mit Phosphatidylcholinmolekülen mit zwei Stearinsäuren (di18:0) haben die gleiche Membrandicke wie mit einer Docosahexaensäure (18:0, 22:6) (Holte et al., 1995). Dies ist in der hohen Flexibilität der DHA begründet, dessen endständige Methylgruppe eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Lipid-Wasser-Grenzfläche aufweist, was für eine gekrümmte Anordnung der Fettsäure in der Membran spricht (Mihailescu und Gawrisch, 2006). Die Konformationsänderungen der DHA-Kette finden dabei in einem Zeitbereich von Nanosekunden statt (Soubias und Gawrisch, 2007). Durch diese Flexibilität benötigt die DHA eine größere Querschnittsfläche als gesättigte Fettsäuren (Zerouga et al., 1995). Dies wiederum steht im direkten Zusammenhang mit einer verminderten Packungsdichte, wie sie von Litman und Mitchell (1996) in Diskmembranen und künstlichen PC-Vesikeln bestimmt wurde. Eine weitere Besonderheit DHA-reicher Membranen ist ihre erhöhte Permeabilität. Diese wurde sowohl für Ionen als auch für Moleküle wie Wasser und Glucose bestimmt (Stillwell et al., 2005). Die Bestimmung der Transmembranbewegung von fluoreszenzmarkiertem Phosphatidylethanolamin in künstlichen PC-Vesikeln mit unterschiedlichem Gehalt an Doppelbindungen zeigte, dass die Halbwertszeiten von 11,5 Stunden bei 18:0-18:1 PC auf 30 Minuten bei 18:0-22:6 PC und 5 Minuten bei 22:6-22:6 PC sanken (Armstrong et al., 2003). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die DHA eine schnelle Transmembranbewegung begünstigt. All diese genannten Eigenschaften der DHA haben einen großen Einfluss auf die Eigenschaften der Diskmembranen (1.1.3).

1.1.2 Cholesterol

Ein weiterer wichtiger Bestandteil von tierischen Membranen ist das Cholesterol. Sein Anteil variiert sehr stark in den verschiedenen Membranen einer Zelle und kann bis zu 50 mol% in der Plasmamembran erreichen. Das Cholesterol besteht aus einem starren, planaren Sterol-Ring mit einer flexiblen Isooctyl-Kette am Kohlenstoffatom 17 und einer polaren Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 3 (Abbildung 3). Letztere verleiht dem Molekül einen amphiphilen Charakter, da das restliche Molekül hydrophob ist (Yeagle, 1985). Diese Eigenschaft bestimmt die Orientierung des Cholesterols in der Membran parallel zu Membrannormalen und somit auch parallel zu den Fettsäureketten der Phospholipide. Die Hydroxylgruppe befindet sich im Bereich der Lipid-Wasser-Grenzfläche, wo es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Carbonylgruppen der Phospholipide oder auch Wassermolekülen kommen kann (Wong et al., 1989).

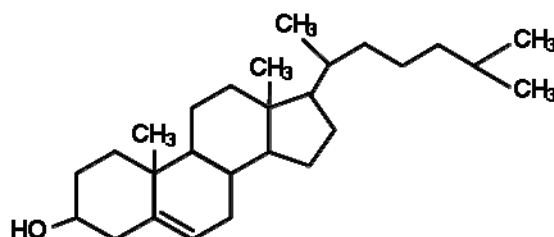


Abbildung 3: Struktur des Cholesterol

Eine der wichtigen Funktionen von Cholesterol ist die Modulierung der physikochemischen Eigenschaften der Membran. Die effektive Länge des Cholesterolmoleküls entspricht einer *all-trans*-Fettsäure mit 17 Kohlenstoffatomen (McMullen et al., 1993). Durch seine Orientierung in der Membran hat es direkten Kontakt zu den Fettsäureketten der Phospholipide und kann, wie im Folgenden erläutert, Einfluss auf deren Anordnung und Beweglichkeit nehmen.

Phospholipidmembranen können in verschiedenen, temperaturabhängigen Phasenzuständen vorliegen. Der wichtigste Phasenübergang verläuft vom Gelzustand (L_β) in den flüssig-kristallinen Zustand (L_α). Im Gelzustand liegen alle Fettsäureketten in der *all-trans*-Konfiguration vor. Die laterale Diffusion der Lipide ist stark eingeschränkt (Abbildung 4 A). Im flüssig-kristallinen Zustand (auch flüssig-ungeordnet (l_d) genannt) dagegen kommt es zu *trans-gauche*-Isomerisierungen der Fettsäureketten, was deren Flexibilität erhöht und die Dicke der Membran vermindert. Die laterale Diffusion ist deutlich erhöht (Abbildung 4 B).

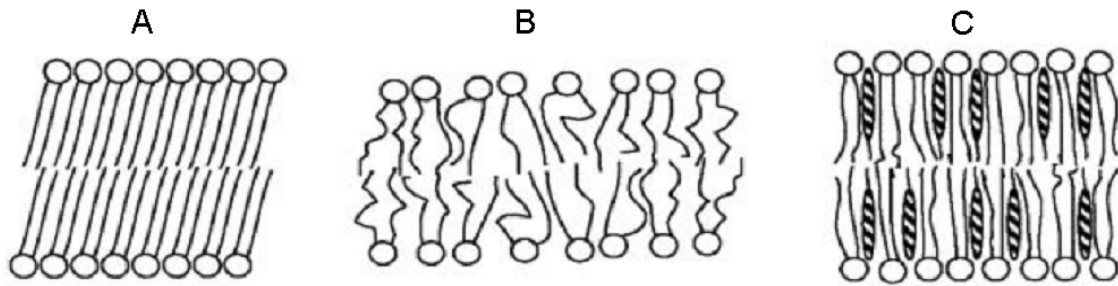


Abbildung 4: Verschiedene Phasen in Membranen

A: gel, B: flüssig-kristallin, C: flüssig-geordnete, Grafik entnommen aus: Munro (2003)

Cholesterol hat einen starken Einfluss auf dieses Phasenverhalten. Es kann den Übergang der beiden Phasen verbreitern. D.h. der Einbau von Cholesterol in eine Membran im Gelzustand führt zu einer Abnahme der Ordnung im Bereich der Fettsäureketten, wogegen es in einer flüssig-kristallinen Membran zur Erhöhung dieser Ordnung durch Reduktion der *trans-gauche*-Isomerisierung führt. Zusätzlich zu den beiden genannten Phasen ist die flüssig-geordnete Phase (l_o) von biologischer Bedeutung. Sie entsteht nur in Membranen mit Cholesterol. Dabei sind die Fettsäureketten dicht gepackt, haben aber im Gegensatz zur Gelphase eine hohe laterale Mobilität (Almeida et al., 1992) (Abbildung 4 C).

Diese l_o -Phasen spielen in biologischen Membranen eine besondere Rolle. Die s.g. *rafts* befinden sich in diesem Zustand. Laut Definition handelt es sich bei *rafts* um kleine (10-200 nm), heterogene, sehr dynamische, Sterol- und Sphingolipid angereicherte Membrandomänen, die zelluläre Prozesse räumlich voneinander trennen (Pike, 2006). Das Konzept der *rafts* wurde von Simons und Ikonen (1997) ausführlich beschrieben. Im Abschnitt der Diskmembranen wird auf diese Domänen noch einmal genauer eingegangen.

Die Anzahl der Doppelbindungen spielt bei der Wechselwirkung zwischen Cholesterol und Phospholipiden eine wichtige Rolle. Diese Wechselwirkungen bestehen hauptsächlich aus van der Waals- und hydrophoben Kräften (Aittoniemi et al., 2007). Die hohe Flexibilität der Fettsäurekette der DHA (22:6) führt zu sterischen Unverträglichkeiten mit dem starren Sterol-Ring des Cholesterols. Dies spiegelt sich in der verminderten Löslichkeit des Cholesterols in Membranen mit di22:6 PC wider. Die Löslichkeit ist auf 11 mol% verringert im Vergleich zu 55 mol% in 18:0-22:6 PC Membranen (Brustowicz et al., 2002), was mit einer bevorzugten Wechselwirkung von Cholesterol mit gesättigten Fettsäuren gegenüber ungesättigten erklärt werden kann.

Auch im Bereich der Kopfgruppen gibt es Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen Cholesterol und den Phospholipiden. So sinken die Wechselwirkungen in der Reihenfolge von Sphingomyelin > Phosphatidylcholin > Phosphatidylserin > Phosphatidylethanolamin, wobei die Unterschiede zwischen PE und PS gering sind (Ohvo-Rekilä et al., 2002). Diese Unterschiede werden hauptsächlich von der Größe, Ladung und Möglichkeit der Bildung von Wasserstoffbrücken bestimmt. In Membranen mit mehreren Lipidsorten können diese Bevorzugungen zu einer heterogenen Verteilung der Lipide führen (Brustowicz et al., 2002, Niu und Litman, 2002).

Da viele Organismen bei konstanter Temperatur und Druck leben, müssen die Membraneigenschaften über ihre Zusammensetzung reguliert werden. Die oben beschriebenen Eigenschaften und Wechselwirkungen der Lipide machen deutlich, dass dies durch die hohe strukturelle Variabilität gewährleistet werden kann.

1.1.3 Die Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes

In der Retina der Säugetiere gibt es zwei Arten von Photorezeptoren. Die Zapfen sind verantwortlich für das Farbsehen und die Stäbchen für das Dämmerungssehen. Die Stäbchenzelle ist aus einem Außen- und einem Innensegment aufgebaut, die über ein Zilium miteinander verbunden sind. Das Innensegment enthält alle metabolischen Zellkompartimente wie die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Komplex und endet in einer Synapse, welche die Reize an nachgeschaltete Nervenzellen weiterleitet. Das Außensegment ist spezialisiert auf die Detektion von Licht und dessen Umwandlung in ein elektrisches Signal.

Das Stäbchenaußensegment von Wirbeltieren besteht aus einem Stapel von etwa 500 bis 2000 dicht gepackten Diskvesikeln, die von einer Plasmamembran umschlossen sind (Daemen, 1973). In den Diskmembranen ist der Photorezeptor Rhodopsin sehr dicht gepackt, mit einer Oberflächendichte von ca. 25000 Molekülen pro μm^2 (Pugh und Lamb, 2000). Dies entspricht bei Mäusen einer Anzahl von ca. 80000 Rhodopsinmolekülen pro Diskvesikel (Palczewski, 2006).

Die Diskvesikel werden kontinuierlich erneuert, indem am basalen Ende des Stäbchenaußensegmentes, nahe des Ziliums, neue Diskvesikel gebildet und innerhalb von etwa zehn Tagen zum apikalen Ende verlagert werden (Young, 1967). Dort erfolgt deren Phagozytose vom aufgelagerten retinalen Pigmentepithel (RPE) (Bairati und Orzalesi, 1963), wodurch das Außensegment eine konstante Länge behält.

Es gibt zwei verschiedene Theorien zur Bildung der neuen Diskvesikel am basalen Ende: 1. das „*vesicle targeting model*“ und 2. das „*evagination/disc rim formation model*“ (Chuang et al, 2007) (Abbildung 5). Das erste basiert auf der Vermutung, dass die neuen Diskvesikel durch Fusion von endozytotischen Plasmamembranvesikeln und Lipid-Protein-Vesikeln des Innensegmentes entstehen. Das zweite Modell geht von einer Umstülpung der Plasmamembran oberhalb des Ziliums aus, wodurch anfänglich s.g. offene Disks entstehen, und einer anschließenden Ausbildung der Randregion (Steinberg et al., 1980).

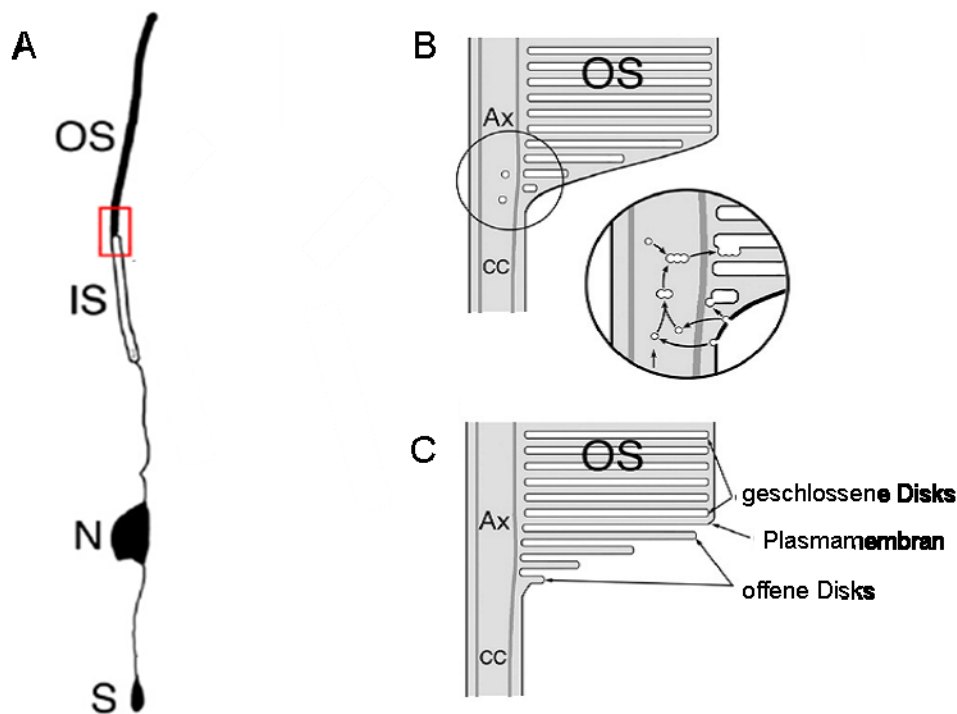


Abbildung 5: Bildung neuer Diskvesikel

A: schematische Darstellung einer Stäbchenzelle, B: Illustration des „*vesicle targeting model*“ C: Illustration des „*evagination/disc rim formation model*“; Abkürzungen: OS: Außensegment, IS: Innensegment, N: Zellkern, S: Synapse, Ax: Axonem des Ziliums, CC: Zilium, modifizierte Grafik entnommen aus Chuang et al. (2007)

Da die Plasmamembran in beiden Theorien einen großen Anteil am Lipidmaterial bereitstellt, erklären beide den höheren Cholesterolgehalt der basalen Diskmembranen gegenüber den apikalen Membranen. Lipidanalysen des Stäbchenaußensegmentes ergaben einen Cholesterolgehalt der Plasmamembran von etwa 28 mol%, der basalen Diskmembranen von 24 mol% und der apikalen von 5 mol% (Boesze-Battaglia und Albert, 1990). Diese heterogene Verteilung des Cholesterols entlang des Stäbchenaußensegmentes wurde erstmals mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beschrieben (Andrews und Cohen, 1983, Caldwell und McLaughlin,

1985). Zusätzlich zum Cholesterol unterscheiden sich die Disk- und Plasmamembran auch in ihrer Phospholipidkopfgruppen und –fettsäurezusammensetzung. Im Vergleich zur Diskmembran hat die Plasmamembran einen geringeren Anteil an PE, jedoch einen höheren Anteil an PS (Boesze-Battaglia und Albert, 1992). Der Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist in der Diskmembran deutlich höher als in der Plasmamembran (Boesze-Battaglia und Albert, 1989). Dabei beträgt der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA in den Diskmembranen ca. 50 % (Stinson et al., 1991). Die Verteilung der Phospholipide in den beiden Lipidschichten der Diskmembran wurde mit Hilfe von spinmarkierten Phospholipiden untersucht und ergab eine asymmetrische Verteilung von PS, mit einer Bevorzugung der äußeren Lipidschicht sowie eine symmetrische Verteilung von PC und PE (Wu und Hubbell, 1993, Hessel et al, 2000).

Die Diskvesikel bestehen aus zwei lamellaren Bereichen, die über eine Randregion miteinander verbunden sind. Die Randregion ist eine Struktur mit sehr starker Krümmung, die im Gegensatz zum lamellaren Bereich kein Rhodopsin enthält (Corless et al., 1987). Sie enthält dagegen Proteine wie den Lipidtransporter ABCA4 (Illing et al., 1997) und das Fusionsprotein Peripherin/rds (Boesze-Battaglia et al, 1998).

In den letzten Jahren wurde das Thema der Membrandomänen sehr intensiv diskutiert und durch das Auflösen der Membran mit Hilfe von Detergens untersucht. Auch von Membranen des Stäbchenaußensegmentes wurden Untersuchungen zur Detergensresistenz durchgeführt. Dabei wurden die Membranen bei 4 °C mit niedrigen Konzentrationen (0,5-2 %) des Detergens Triton X-100 solubilisiert und anschließend mit Hilfe einer Dichtezentrifugation aufgetrennt (London und Brown, 2000). Die Trennung in detergens-resistente bzw. detergens-lösliche Membranen wurde über die Unlöslichkeit von Membranen in der Gelphase erklärt (Ribeiro und Dennis, 1973) und in direkten Zusammenhang mit den geordneten Membrandomänen, den *rafts* gebracht. Dieser direkte Zusammenhang wird heute jedoch angezweifelt. Heerklotz et al. konnten 2003 zeigen, dass unterschiedliche Wechselwirkungen verschiedener Membranlipide mit dem Detergens Triton X-100 zur Bildung dieser Domänen führen können. Die Entstehung von detergens-resistenten und detergens-löslichen Membranfraktionen lässt jedoch den Schluss zu, dass einige Membrankomponenten häufiger miteinander interagieren als andere.

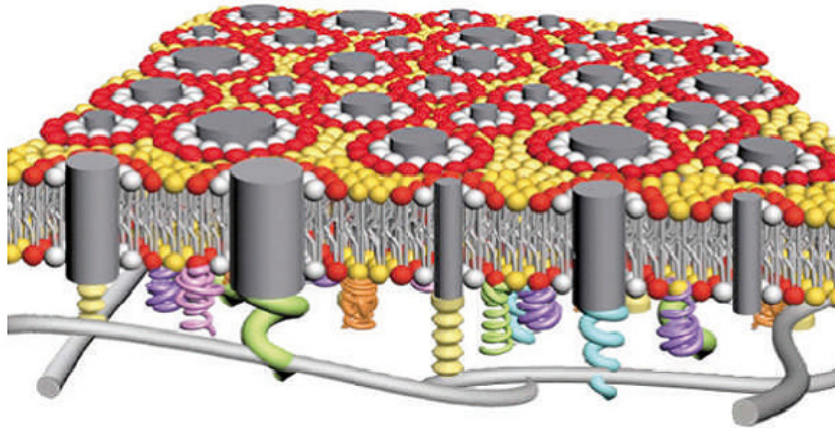


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Membran mit einer Proteindichte von $30000 \mu\text{m}^{-2}$

Grafik entnommen aus: Jacobson et al. (2007)

Die laterale Verteilung der Membranbestandteile spielt eine wichtige Rolle in den Untersuchungen zur Membran- bzw. Proteinfunktion, auch in Membranen mit einer hohen Proteindichte wie in Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes oder den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Komplexes (Jacobson et al., 2007) (Abbildung 6). In Abbildung 6 wird eine mögliche laterale Organisation in solch proteinreichen Membranen verdeutlicht. Aufgrund der hohen Proteindichte ist die Größe reiner Lipidareale sehr begrenzt.

Das Wissen über die laterale Verteilung der Membranbestandteile (Lipide und Proteine) in nativen Systemen, wie den Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes ist wichtig für das Verständnis der Funktionsweise von Prozessen wie der visuellen Signaltransduktion.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der heterogenen Verteilung des Cholesterols entlang des Stäbchenaußensegmentes und dessen Einfluss auf die visuelle Signaltransduktion. Dabei wurde auch die Verteilung des Cholesterols innerhalb der Diskmembran untersucht.

1.2 Die Signaltransduktion

Äußere Reize wahrnehmen zu können, ist für alle Lebewesen, egal ob Einzeller oder komplexere Formen, lebensnotwendig. Mit Hilfe von biochemischen Prozessen reagieren Zellen auf chemische oder physikalische Signale, wie Hormone, Geruchsstoffe, Neurotransmitter oder Licht. Dabei wird der äußere Reiz von einem spezialisierten Rezeptormolekül erfasst, in ein zelluläres Signal umgewandelt und häufig auch verstärkt. Dies geschieht über nachgeschaltete, enzymatische Schritte, die dann eine zelluläre Antwort auslösen.

Die Rezeptorfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *G protein coupled receptors*) bildet die größte Klasse innerhalb der Rezeptorproteine und ist mit über 600 Genen die viertgrößte Gruppe im menschlichen Genom (Lu et al., 2002). Ein wichtiges Merkmal sind die sieben Transmembranhelices. Der erste Schritt in der Signaltransduktion dieser Rezeptoren führt zu einer katalytischen Aktivierung eines Guaninnukleotid-bindenden Proteins (s.g. G-Protein). Dieses wiederum aktiviert ein Effektorprotein, das seinerseits die zytosolische Konzentration von sekundären Botenstoffen (*second messenger*) reguliert. Die Erhöhung oder Erniedrigung der Konzentration dieser Botenstoffe führt zu Veränderungen der Aktivität zytosolischer Enzyme oder Ionenkanäle, was der Zelle vielseitige Möglichkeiten gibt, auf das Signal zu reagieren. Die Folge mehrerer nachgeschalteter Schritte nach Detektion des Signales durch ein Rezeptormolekül gestattet der Zelle vielfältige Regulierungsmechanismen. Auch eine hohe Verstärkung des Signales wird dadurch ermöglicht.

Die visuelle Signaltransduktion dient als Modellsystem für das Verständnis der Mechanismen der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion. Die in der Stäbchenzelle untersuchten molekularen und regulativen Mechanismen lassen sich auf analoge Prozesse anderer zellulärer Systeme übertragen.

1.2.1 Die visuelle Signaltransduktion

In der visuellen Signaltransduktion erfolgt die Umwandlung des Signales Licht in eine elektrische zelluläre Antwort, welche über die Nerven zum Gehirn gelangt und dort als Sehempfindung verarbeitet werden kann. In der Retina gibt es zwei verschiedene Photorezeptorzellen, die Stäbchen und die Zapfen. Die Stäbchen sind für das Sehen bei geringer Helligkeit (skotopisch) verantwortlich und bilden mit ca. 95 % die Mehrheit der Photorezeptoren in der menschlichen Retina (Eysel, 2007). Die Zapfen dagegen vermitteln das Farbsehen bei Tageslicht (photopisches Sehen), stellen aber mit nur 5 % den geringeren Anteil der Photorezeptorzellen.

Das Rezeptorprotein der visuellen Signaltransduktion der Stäbchenzelle ist das Rhodopsin. Es besteht aus dem Apoprotein Opsin, an das der Chromophor 11-*cis*-Retinal kovalent gebunden ist. Die Absorption eines Photons führt zur Isomerisierung des Chromophors zu all-*trans*-Retinal (Hubbard und Wald, 1952), was eine Kette von Konformationsänderungen des Rhodopsins zur Folge hat. Über die Photointermediate Batho und Lumi gelangt der Rezeptor in ein Gleichgewicht der beiden Metarhodopsine I und II. Die aktive Rezeptorkonformation Metarhodopsin II (Meta II) bindet und aktiviert das G-Protein Transducin (Gt), indem es den

Nukleotidaustausch in der α -Untereinheit ($G\alpha$) katalysiert (Abbildung 7). Dies stellt den ersten Schritt in der Verstärkung des Signales dar, da ein lichtaktiviertes Rhodopsin mehrere hundert Transducin-Moleküle aktivieren kann (Heck und Hofmann, 2001).

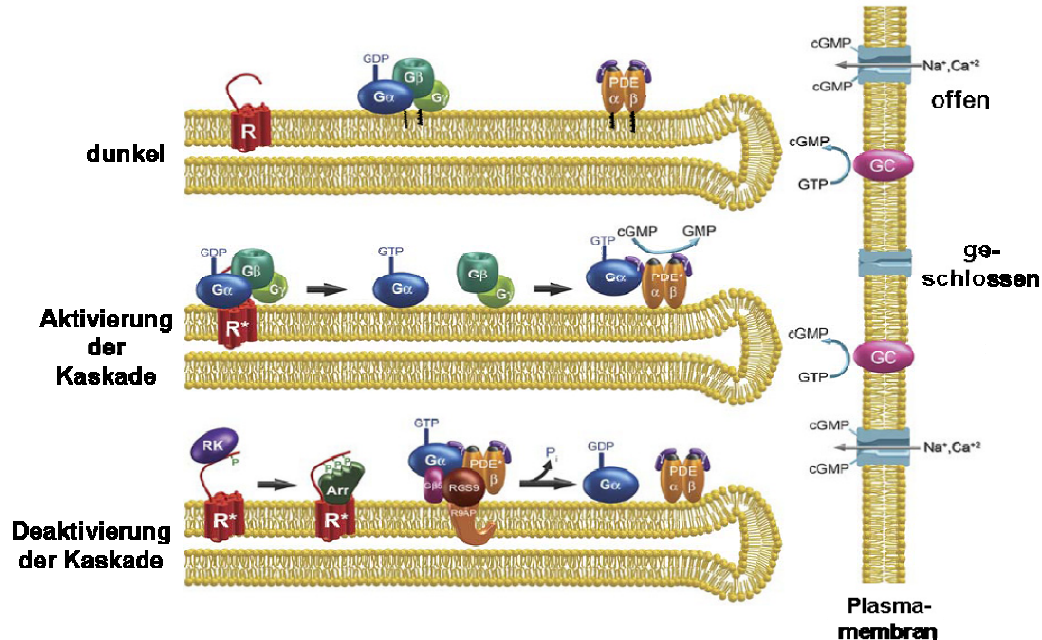


Abbildung 7: Schematische Darstellung der visuellen Signaltransduktion - Aktivierung und Deaktivierung

Die obere Diskmembran illustriert den dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins (R), Transducins ($G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten) und der Phosphodiesterase ($PDE\alpha\beta$ -, $PDE\gamma$ -Untereinheiten), die mittlere Diskmembran illustriert die lichtinduzierte Aktivierung dieser Proteine. Die Reaktionen in der untersten Diskmembran illustrieren die Deaktivierung des Rhodopsins über die Phosphorylierung durch Rhodopsinkinase (RK) und anschließender Bindung von Arrestin (Arr) und Transducin/PDE-Deaktivierung durch den RGS9-1/ $G\beta$ 5/R9AP-Komplex. Die entsprechenden Änderungen des Kationenkanals sind dargestellt. Die Guanylylzyklase (GC) ist nur in der Plasmamembran dargestellt. Grafik entnommen aus: Burns und Arshavsky (2005) und modifiziert

Die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit bindet anschließend an das Effektorprotein, eine Phosphodiesterase (PDE), was zur Inaktivierung ihrer inhibitorischen γ -Untereinheiten führt. Die so aktivierte PDE hydrolysiert mehrere tausend Moleküle des Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Sitaramayya et al., 1986, Bruckert et al., 1994), was den 2. Verstärkungsschritt darstellt. Die Konzentrationsverminderung des cGMP hat die Schließung von cGMP-abhängigen Kationenkanälen in der Plasmamembran zur Folge (Fesenko et al., 1985). Da in dem dunkeladaptierten Außensegment der Photorezeptorzelle ein stetiger Kationeneinstrom durch diese Kanäle erfolgt, der durch einen stetigen Kationenausstrom im Innensegment ausgeglichen wird (*circulating current*), führt die Schließung der Kanäle zur Hyperpolarisation der Plasmamembran (Pugh und Lamb, 1990). Diese Hyperpolarisation stoppt die

Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, wodurch nachgeschaltete Zellen (z.B. Bipolarzellen) angesprochen werden, und somit das Signal weiter bis zum Gehirn geleitet wird (Baylor, 1996).

Die Abschaltung der Signalvorgänge ist notwendig, um die zeitliche Auflösung des Sehprozesses zu gewährleisten. Die Deaktivierung des lichtaktivierten Rhodopsins geschieht durch dessen Phosphorylierung durch die Rhodopsinkinase (Mendez et al., 2000), was die Bindung des Arrestins ermöglicht (Vishnivetskiy et al., 2000). An den Meta II-Arrestin-Komplex kann kein weiteres Transducin binden. Der Zerfall von Rhodopsin in Opsin und all-*trans*-Retinal entlässt Arrestin aus der Bindung und macht Opsin zugänglich für die Regenerierung (Palczewski et al., 1989).

Die Deaktivierung des $G\alpha$ -PDE-Komplexes geschieht durch die Verstärkung der intrinsischen GTPase-Aktivität von $G\alpha$ durch einen Multiproteinkomplex bestehend aus dem RGS9-1 (*regulator of G protein signaling*) mit seiner Untereinheit $G\beta 5$ und dem Membrananker R9AP (*RGS9-1 anchor protein*) (Hu und Wensel, 2002). Die Hydrolyse des GTP zu GDP führt zur Dissoziation von $G\alpha$ von der PDE, wodurch die inhibitorischen γ -Untereinheiten die weitere Hydrolyse von cGMP unterdrücken. Die Wiederherstellung der Dunkelkonzentration von cGMP und damit die Öffnung der cGMP-abhängigen Kationenkanäle erfolgt über die Guanylylzyklase (Baylor, 1996) und schließt die Deaktivierung der Signalkaskade ab.

1.2.2 Rhodopsin

Der Photorezeptor Rhodopsin ist in den Diskmembranen sehr dicht gepackt. Er nimmt etwa 30 % der Membranoberfläche ein (Calvert et al., 2001) und ist mit über 80 % das häufigste Protein des Stäbchenaußensegmentes (Papermaster und Dreyer, 1974). Das Stäbchenaußensegment ist damit so spezialisiert, dass es einzelne Photonen detektieren kann (Baylor et al., 1979b). Die Kristallstruktur des Rhodopsins wurde erstmals 2000 von Palczewski et al. mit einer Auflösung von 2,8 Å veröffentlicht. Weitere Verbesserungen der Strukturauflösung folgten von Teller et al. (2001), Okada et al. (2002 und 2004) und Li et al. (2004). Die Struktur des ligandenfreien Opsins wurde von Scheerer et al. (2008) und Park et al. (2008) veröffentlicht. Das Rhodopsin hat eine elliptische, zylindrische Form mit einer Höhe von etwa 7,5 nm senkrecht zur Membran und einer Fläche parallel zur Membranoberfläche von etwa 12 nm², wobei die zytoplasmatische Seite etwas größer in Volumen und Fläche ist, als die intradiskale Seite.

Das Rhodopsin besteht aus 348 Aminosäuren, die die Membran siebenmal in Form von α -Helices durchspannen. Die Helices sind teilweise gewinkelt und zur Membrannormalen geneigt. Sie sind durch Schleifenregionen (*loops*) miteinander verbunden und erhalten zusätzliche Stabilität durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 110 und 187 und Palmitylierungen an den Cysteinen 322 und 323. Nahe des C-Terminus sind die Aminosäuren 311 bis 321 in einer helikalen Struktur parallel zur Membranoberfläche angeordnet. Diese Struktur wird auch als Helix 8 bezeichnet. Am N-terminalen Ende der Aminosäurekette ist das Rhodopsin posttranslational an Asparagin 2 und 15 glykosyliert. Der Chromophor 11-*cis*-Retinal ist über eine Schiffbase kovalent an das Lysin 296 gebunden und befindet sich in einer hydrophoben Tasche, gebildet von den Transmembranhelices. Im dunkeladaptierten Zustand fungiert das 11-*cis*-Retinal als inverser Agonist, stabilisiert also die inaktive Konformation des Rezeptors und setzt so dessen Basalaktivität herab.

Zwei der wichtigsten konservierten Motive der GPCR-Familie sind das D(E)RY-Motiv in der Helix 3 und das NPxxY-Motiv in der Helix 7. Beide Motive sind, benannt nach der Einbuchstabennomenklatur der Aminosäuren, von großer Bedeutung für die Ausbildung der aktiven Rezeptorkonformation und Aktivierung des G-Proteins (Arnis et al., 1994, Fritze et al., 2003).

Die lichtinduzierte Aktivierung des Rhodopsins beginnt mit der Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zu all-*trans*-Retinal und führt innerhalb von Millisekunden zur Bildung der aktiven Rezeptorkonformation. Das Gleichgewicht zwischen dieser aktiven Rezeptorkonformation Meta II und dem Photointermediat Meta I ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung. Auf die frühen Intermediate wird hier nicht weiter eingegangen und auf Übersichtsartikel wie z.B. Shichida und Imai (1998) verwiesen. Die einzelnen Photointermediate sind durch ihre Absorptionsmaxima im UV/Vis-Bereich unterscheidbar. Das inaktive Rhodopsin hat ein Absorptionsmaximum bei 500 nm und eine protonierte Schiffbase. Nach Isomerisierung des Retinals zu all-*trans* verschiebt es sich bei Meta I zu $\lambda_{\text{max}} = 478$ nm. Die anschließende Deprotonierung der Schiffbase führt zu einer weiteren Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 380 nm, was die Meta II-Form des Rezeptors charakterisiert.

Das Meta I-Meta II-Gleichgewicht ist sowohl temperatur- als auch pH-Wert-abhängig (Parkes und Liebman, 1984). So kann Meta I durch niedrige Temperaturen bzw. hohe pH-Werte stabilisiert werden. Mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass in diesem Photointermediat die ersten strukturellen Veränderungen der Sekundärstruktur nach Lichtaktivierung auftreten (Ernst und Bartl, 2002). Zu weiteren Veränderungen kommt es bei der

Ausbildung von Meta II. Diese beinhalten unter anderem die Bewegung der Transmembranhelix 6 (Knierim et al., 2007), aber auch der Helix 5 und 7 (Patel et al., 2004).

Zusätzlich zur Temperatur- und pH-Abhängigkeit hat die Lipidumgebung einen großen Einfluss auf das Meta I-Meta II-Gleichgewicht. Dabei verschiebt eine Erhöhung der Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren der Phospholipide das Gleichgewicht zu Meta II (Litman und Mitchell, 1996), dagegen führt eine Erhöhung des Cholesterolgehaltes der Lipidvesikel zur Zunahme des Meta I-Anteils (Mitchell et al., 2003). Auch die Position der Doppelbindung entlang der Fettsäurekette hat einen Einfluss auf das Gleichgewicht. So ist der Meta II-Anteil in Membranen mit der Omega-6 Fettsäure Docosapentaensäure (22:5 ω -6) im Vergleich zur Omega-3 Form (22:5 ω -3) deutlich vermindert (Mitchell et al., 2003). Ebenso kann eine Veränderung der Geometrie der Doppelbindung die Lage des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes verändern, wobei der Meta II-Anteil in Membranen mit *cis*-Fettsäuren größer ist als mit *trans*-Fettsäuren (Niu et al., 2005). All diese Effekte beruhen unter anderem auf dem Einfluss der Lipide auf die Mikroviskosität der Membran, die über das s.g. freie Packungsvolumen bestimmt werden kann. Je dichter die Lipide der Membran gepackt sind, umso weiter liegt das Meta I-Meta II-Gleichgewicht auf der Meta I-Seite. Dies ist in der Volumenzunahme von Meta II gegenüber Meta I begründet (Attwood und Gutfreund, 1980).

Ob es spezifische Wechselwirkungen zwischen bestimmten Lipiden und Rhodopsin gibt, ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Es stellt sich die Frage: Beruht die Beeinflussung des Rhodopsins durch die Lipide auf direkten Interaktionen, gibt es spezielle Bindungsstellen oder beeinflussen die Lipide das Rhodopsin indirekt über die Eigenschaften der Membran? Albert et al. (1996) untersuchten die Wechselwirkungen von Cholesterol mit dem Rhodopsin mit Hilfe des fluoreszierenden Cholestatrienols und fanden eine direkte Interaktion mit dem Rhodopsin. Polozova und Litman (2000) verwendeten FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), um die Wechselwirkungen zwischen der DHA und Rhodopsin zu untersuchen. In Phospholipid-Vesikel bestehend aus di16:0 PC und di22:6 PC Cholesterol, kam es zu einer Domänenbildung von di22:6 PC um das Rhodopsinmolekül.

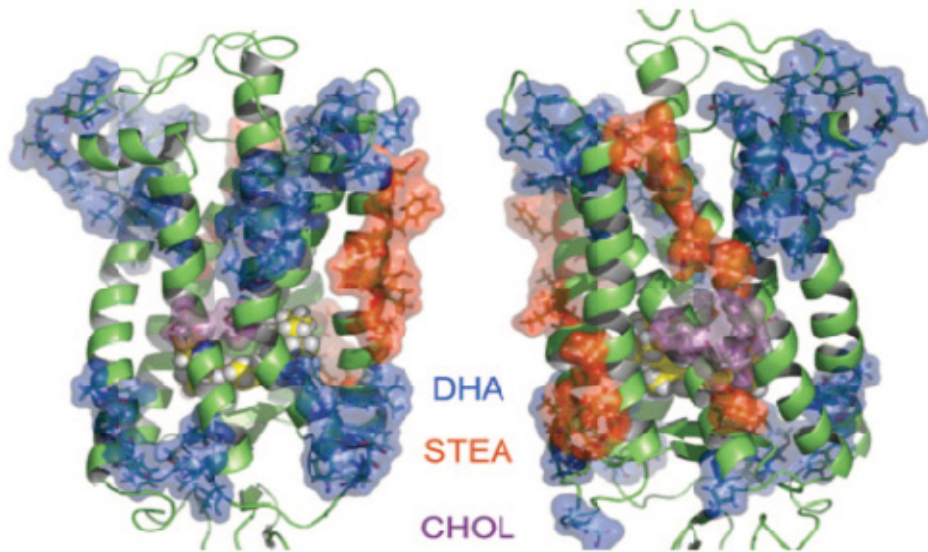


Abbildung 8: Rhodopsinstruktur mit Regionen bevorzugter Wechselwirkung mit Lipiden

Molekulare Dynamik Simulationen von Rhodopsin in einer Membran aus einer Mischung von 18:0,22:6 PE, 18:0,22:6 PC und Cholesterol im Verhältnis 2:2:1 ergab spezielle Regionen am Rhodopsinmolekül (grün), die bevorzugt mit einem der drei Lipide interagieren. DHA: Docosahexaensäure (22:6), STEA: Stearinsäure (18:0), CHOL: Cholesterol; Grafik entnommen aus: Grossfield et al. (2006)

Computersimulationen der Wechselwirkungen von Lipiden mit Rhodopsin (mit den beiden Fettsäuren Stearinsäure (18:0) und DHA (22:6) bzw. Cholesterol) ergaben spezifische Molekülbereiche des Rhodopsins mit Bevorzugung eines der drei Lipide (Grossfield et al., 2006). Der Anteil spezieller Kontaktstellen am Rhodopsin ist für die DHA am größten, aber auch für die Stearinsäure und das Cholesterol wurden, wenn auch deutlich weniger, spezielle Kontaktstellen gefunden (Abbildung 8). Für die Untersuchung des Cholesteroleinflusses auf die Aktivierung des Rhodopsins in den nativen Diskmembranen im Rahmen dieser Arbeit sind diese Ergebnisse von großer Bedeutung.

Wie bereits erwähnt, spielt die laterale Verteilung der Membranbestandteile eine wichtige Rolle im Verständnis von membranassoziierten Prozessen, wie der visuellen Signaltransduktion. AFM-Aufnahmen (*atomic force microscopy*) der Diskmembranen von Mäusen zeigten parakristalline Anordnungen der Rhodopsinmoleküle in Reihen von Dimeren (Liang et al., 2003) und bestärkten damit die Vermutung, dass Rhodopsin als Dimer agiert. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass monomeres Rhodopsin vollständig funktionell ist (Ernst et al., 2007, Edrington et al., 2008, Whorton et al., 2008). Mit Hilfe der Kryoelektronentomographie von Stäbchenaußensegmenten von Mäusen wurde zwar eine heterogene Verteilung der Rho-

dopsinmoleküle vermutet, aber ohne Hinweise auf parakristalline Gebiete (Nickel et al., 2007).

1.2.3 Transducin

Das G-Protein der visuellen Signalkaskade ist das Transducin. Es gehört zu den heterotrimeren G-Proteinen, da es aus den drei Untereinheiten $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ besteht. Die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å wurde 1996 von Lambright et al. veröffentlicht. Die α -Untereinheit besteht aus einer GTPase-Domäne, einer α -helikalen Domäne und der N-terminalen α -Helix, welche von $G\alpha$ herausragt. Die Guaninnukleotid-Bindungstasche befindet sich zwischen der GTPase- und α -helikalen Domäne. Die β -Untereinheit besteht aus einer s.g. β -Propeller-Struktur und einer N-terminalen α -Helix. Letztere ist um die N-terminale α -Helix der γ -Untereinheit gewunden. Die zweite α -Helix von $G\gamma$ interagiert mit der β -Propeller-Struktur von $G\beta$. Beide bilden ein stark assoziiertes Dimer. $G\alpha$ interagiert mit $G\beta\gamma$ über zwei Berührungsflächen. Zum einen besteht ein enger Kontakt zwischen der GTPase-Domäne und der β -Propeller-Struktur und zum anderen zwischen der N-terminalen α -Helix und der Seite der β -Propeller-Struktur.

Transducin ist ein peripheres Membranprotein mit Lipidmodifikationen. Die γ -Untereinheit ist farnesyliert und karboxymethyliert (Fukada et al., 1990) und die α -Untereinheit ist heterogen acyliert (Neubert et al., 1992; Kokame et al., 1992). In der heterotrimeren Form von Gt haben die beiden Lipidmodifikationen engen Kontakt zueinander (Lambright et al., 1996). Untersuchungen zur Membranbindung von Gt mit Hilfe von elektrostatischen Berechnungen haben gezeigt, dass das Protein in einer gewinkelten Position an die Membran bindet, wobei die Lipidanker in die Membran eindringen und das Protein von positiv geladenen Aminosäureseitenketten nahe der Lipidanker in dieser Position stabilisiert wird (Kosloff et al., 2008). In dieser Position ist die Kontaktfläche von Gt mit der Membran sehr klein, was die Interaktion mit nur drei negativ geladenen Phosphatidylserinen in der Diskmembran bestätigt (Hessel et al., 2003).

Im Dunkelzustand sind nahezu alle Transducinmoleküle, in ihrer heterotrimeren, GDP-gebundenen Form, an die Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes gebunden (Kühn, 1980). Die Aktivierung von Transducin durch Meta II führt zur Dissoziation der α -Untereinheit ($G\alpha$ -GTP) vom Rezeptor und der Membran. Dies wird durch die verminderte Membranaffinität von $G\alpha$ im Vergleich zu $G\alpha\beta\gamma$ aber auch zu $G\beta\gamma$ begünstigt (Bigay et al.,

1994, Kosloff et al., 2008). Die geringere Membranbindung von $G\alpha$ beruht auf den abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen $G\alpha$ und der negativ geladenen Diskmembran (Kosloff et al., 2008). Nach Belichtung von ca. 0,1 % der Rhodopsinmoleküle des Stäbchenaußensegmentes, was bereits der Sättigung der Stäbchen und somit dem Sehen mit den Zapfen entspricht, kommt es zur Translokation der Transducin-Untereinheiten in das Stäbcheninnensegment (Sokolov et al., 2002). Dieser Prozess wird unter dem Aspekt der Lichtadaptation diskutiert. Im Dunkelzustand befinden sich nahezu alle Transducinmoleküle im Außensegment, was mit der hohen Membrandichte im Vergleich zum Innensegment erklärt wird (Sokolov et al., 2004). Der Einfluss des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen auf die Membranbindung und Aktivierung von Transducin wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.2.4 Phosphodiesterase

Das Effektorprotein der visuellen Signaltransduktion ist die cGMP-spezifische Phosphodiesterase, PDE, die in einem molaren Verhältnis zu Rhodopsin von 1:40 im Stäbchenaußensegment vorliegt (Baehr et al., 1979). Sie besteht aus den katalytischen Untereinheiten $PDE\alpha$ und $PDE\beta$ und zwei inhibitorischen Untereinheiten $PDE\gamma$ (Deterre et al., 1988). Die beiden katalytischen Untereinheiten $PDE\alpha$ und $PDE\beta$ sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 72 % homolog (Lipkin et al., 1990). Die katalytische Domäne zur cGMP Hydrolyse befindet sich in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Beide Untereinheiten besitzen am C-terminalen Ende Isoprenylmodifikationen, wobei $PDE\alpha$ farnesyliert und karboxymethyliert und $PDE\beta$ geranylgeranyliert ist (Qin et al., 1992, Anant et al., 1992). Diese Lipidmodifikationen dienen der Membranbindung der PDE (Catty et al., 1992).

Die inhibitorischen Untereinheiten unterdrücken die cGMP Hydrolyse im Dunkelzustand des Stäbchenaußensegmentes. Um die PDE zu aktivieren, bindet je eine aktivierte, GTP-bindende Transducin- α -Untereinheit ($G\alpha$ -GTP) an eine $PDE\gamma$ und unterdrückt damit deren inhibitorischen Einfluss. Es bildet sich ein stabiler, membrangebundener Komplex von $(G\alpha)_2$ - $PDE\alpha\beta\gamma_2$ aus (Clerc und Bennett, 1992). Über den Einfluss der einzelnen γ -Untereinheiten auf die Gesamtaktivität der PDE gibt es unterschiedliche Aussagen. Zum einen wurde gezeigt, dass schon die Bindung von $G\alpha$ -GTP an die erste Bindungsstelle zu 80-100 % der maximalen PDE-Aktivität führt (Bruckert et al., 1994), zum anderen, dass die erste Bindungsstelle zwar eine hohe Affinität zu $G\alpha$ -GTP hat, die Aktivität der PDE damit aber nur 5-10 % erreicht (Bennett und Clerc, 1989).

Die dreidimensionale Struktur mit einer Auflösung von ca. 30 Å zeigt eine abgeflachte Glockenform der PDE mit den katalytischen Domänen von PDE α und PDE β im direkten Kontakt mit der Membran (Kajimura et al., 2002). Sowohl strukturelle als auch biochemische Untersuchungen haben eine direkte Wechselwirkung des N-terminalen Endes von G α mit dem C-terminalen Ende von PDE γ gezeigt (Slep et al., 2001, Grant et al., 2006). Eine Berechnung der benötigten Membranoberfläche des (G α)₂-PDE $\alpha\beta\gamma$ -Komplexes ergab eine Anzahl von 50-250 Phospholipiden (Malinski und Wensel, 1992). In nativen Diskmembranen wurde eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung von etwa 70 Phospholipiden PC und PE mit einem PDE-Molekül ermittelt (Hessel et al., 2003).

Der Einfluss der Membran auf die PDE-Aktivität wurde bis jetzt nur indirekt bestimmt. So hängt die PDE-Aktivität sehr stark von der Anwesenheit von Membranen ab (Bennett und Clerc, 1989, Malinski und Wensel, 1992). In der Plasmamembran des Stäbchenaußensegmentes wurde eine verminderte PDE-Aktivität im Vergleich zu den Diskmembranen bestimmt (Boesze-Battaglia und Albert, 1990). Da sich diese beiden Membranen aber sowohl in der Phospholipidzusammensetzung als auch im Cholesterolgehalt unterscheiden und die PDE-Aktivität auch indirekt über eine verminderte Meta II-Bildung beeinflusst sein kann, können keine Aussagen über den Einfluss einzelner Lipide auf die PDE-Aktivität gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die PDE-Membranbindung und Aktivität untersucht.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die visuelle Signaltransduktion dient als Modell für die Mechanismen der Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Wechselwirkungen der Proteine der Signalkaskade untereinander aber auch mit der Membran geben Hinweise auf Funktionsmechanismen in anderen zellulären Systemen.

Der Ort der visuellen Signaltransduktion ist das hoch spezialisierte Stäbchenaußensegment. Es besteht aus einem Stapel von flachen Diskmembranen, die von einer Plasmamembran umgeben sind. Entlang dieses Außensegmentes existiert ein Cholesterolgehalt, mit einem Cholesterolgehalt von 24 mol% in den basalen Diskmembranen und nur 5 mol% in den apikalen. Die Verteilung des Rhodopsins (Boesze-Battaglia et al., 1989) und des G-Proteins (Sokolov et al., 2002, Sokolov et al., 2004) ist in allen Diskmembranen gleich. Somit befinden sie sich innerhalb eines Zellkompartimentes in unterschiedlichen Lipidumgebungen. Welchen Ein-

fluss der unterschiedliche Cholesterolgehalt auf die visuelle Signaltransduktion hat, ist daher von großem Interesse.

Mit zwei verschiedenen Herangehensweisen wurden die Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und den Proteinen der visuellen Signalkaskade in den letzten zwei Jahrzehnten untersucht. Die erste umfasst den Einfluss einzelner Lipide auf das Rezeptorprotein Rhodopsin rekonstituiert in künstliche Lipidvesikel. Dabei standen die Bedeutung der Doppelbindungen der Fettsäuren der Phospholipide und deren Interaktionen mit Cholesterol (Litman und Mitchell, 1996, Mitchell et al., 2001, Niu et al., 2001, Mitchell et al., 2003) und deren Kopfgruppen (Gibson und Brown, 1993, Alves et al., 2005) im Vordergrund. Die zweite Herangehensweise bestand in der Trennung der nativen Diskmembranen in Abhängigkeit von deren Cholesterolgehalt durch Beladung der Membranen mit Digitonin und anschließender Dichtezentrifugation (Boesze-Battaglia et al., 1989) und im Vergleich der Diskmembranen mit der Plasmamembran (Boesze-Battaglia und Albert, 1990, Boesze-Battaglia und Allen, 1998).

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die ersten drei Proteine der visuellen Signalkaskade, das Rhodopsin, das G-Protein Transducin und die Phosphodiesterase, in den nativen Membranen zu untersuchen. Somit ergänzt diese Arbeit die Untersuchungen in künstlichen Systemen, indem die nativen Diskmembranen verwendet werden, und weitet diese auf das G-Protein und die Phosphodiesterase aus.

Um die Wechselwirkung des Cholesterols mit diesen Proteinen charakterisieren zu können, ist ein Verständnis über die Verteilung und Beweglichkeit des Cholesterols wichtig. Untersuchungen dahingehend und auch zu Wechselwirkungen mit den Phospholipiden der Diskmembranen sind ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Für ein besseres Verständnis über den Einfluss der Lipidumgebung auf die visuelle Signaltransduktion beizutragen und somit auch die Bestimmung des Außensegmentbereiches indem die Signaltransduktion adäquat stattfindet, sind die Anliegen dieser Arbeit.

2 Materialien und Methoden

2.1 Präparationen

2.1.1 Präparation von Stäbchenaußensegmenten (*rod outer segment, ROS*)

Alle Arbeiten wurden bei Rotlicht (Rotfilter RG 650 der Firma Schott) durchgeführt, um eine Aktivierung des Photorezeptors Rhodopsin zu verhindern. Retinae wurden aus Rinderaugen präpariert, indem der Augapfel durch einen Schnitt in die Cornea geöffnet und umgestülpt wurde. Der Glaskörper und die Linse wurden entfernt. Da die Retina dem Pigmentepithel nur lose aufliegt, konnte sie in Richtung des *Nervus opticus* zusammengeschoben werden. Nach dem Abschneiden der Retina wurde diese in eine eisgekühlte 45 %ige Saccharoselösung in Puffer 1 (41 mM K_2HPO_4 , 26 mM KH_2PO_4 , 1 mM $Mg(Az)$, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0,1 μ M Aprotinin, 5 μ M Leupeptin, 10 mM Glucose, pH 7,0) im Verhältnis 1:1 überführt und bei -40 °C eingefroren.

Die Präparation der Stäbchenaußensegmente erfolgte nach Vorlage von Papermaster (1982). Zunächst wurden die gefrorenen Retinae aufgetaut. Um die Außensegmente der Stäbchenzellen abzutrennen, wurde die Suspension für zwei Minuten geschüttelt und anschließend fünf Minuten zentrifugiert (3000 g, 4 °C). Der so gewonnene Überstand wurde über ein Baumwollnetz filtriert, verdünnt (1:1 mit Puffer 1) und zentrifugiert (12000 g, 4 °C, 10 min). Es folgte das Aufsichten des in Puffer 1 resuspendierten Pellets auf diskontinuierliche Saccharosegradienten ($\rho = 1,10; 1,11; 1,13$ und $1,15 \text{ g/cm}^3$) und deren Zentrifugation (26500 g, 4 °C, 20 min). Die Außensegmente sammelten sich an der $1,11 \text{ g/cm}^3$ - $1,13 \text{ g/cm}^3$ -Grenzfläche. Diese Bande wurde abgenommen und mit Puffer 1 (1:1) verdünnt. Nach kurzem Mischen folgte eine Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 10 min). Das so gewonnene Pellet enthielt die Stäbchenaußensegmente, welches mit Puffer 1 resuspendiert und erneut zentrifugiert wurde (4800 g, 4 °C, 20 min). Die Bestimmung der Rhodopsinkonzentration erfolgte absorptionsspektroskopisch (siehe 2.7.1).

2.1.2 Präparation von Diskvesikeln

Die Präparation osmotisch intakter Diskvesikel erfolgte in modifizierter Form nach der Vorlage von Smith et al. (1975). Hierzu wurden Stäbchenaußensegmente (2 mg Rhodopsin) mit

5 ml Aqua dest. vermischt, um die Plasmamembran osmotisch zum Platzen zu bringen. Nach kräftigem Mischen folgte eine Zentrifugation (36600 g, 4 °C, 30 min). Das Pellet (2 mg Rhodopsin) wurde in 8 ml einer 3,5 %igen Ficoll-Lösung für 14 Stunden bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (140000 g, 4 °C, 2 h). Die osmotisch intakten Diskvesikel befanden sich in einer Bande unmittelbar unterhalb der Oberfläche der Ficoll-Lösung. Diese Bande wurde mit einer Spritze abgenommen und mit Puffer 2 (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4) / 5 % Saccharose vermischt. Nach einer Zentrifugation (36600 g, 4 °C, 30 min) wurde das Pellet in Puffer 3 (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 % Saccharose, pH 7,4) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der anschließenden Resuspension des Pellets in Puffer 3 folgte die Filtration der Probe durch einen Nuclepore-Filter (Porengröße 2 µm). Die Rhodopsinkonzentration wurde absorptionsspektroskopisch bestimmt und daraus die Lipidkonzentration der Diskmembransuspension berechnet (siehe 2.7.1). Um eine Lipidperoxidation der Fettsäuren zu verhindern, erfolgte die Zugabe von BHT (2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol) im Verhältnis 200:1 (Lipid:BHT) zur Diskmembranensuspension. Die so präparierten Diskmembranen wurden anschließend sofort im Versuch eingesetzt.

2.1.3 Isolation von Phosphodiesterase und Transducin aus ROS

Die Präparation der beiden peripheren Membranproteine Phosphodiesterase (PDE) und Transducin (Gt) aus Stäbchenaußensegmenten erfolgte nach Vorlage von Heck und Hofmann (1993). Beide Proteine können mit einer hypotonen Lösung von der Diskmembran gelöst werden. Durch zusätzliche Aktivierung des Rezeptors, an welchen das Transducin bindet, ist es möglich, die PDE getrennt vom Transducin zu isolieren. Erst durch Zugabe von GTP und der damit verbundenen Aktivierung von Gt wird die Transducinbindung an den Rezeptor aufgehoben.

Die ersten Schritte der Präparation erfolgten unter Rotlicht. Alle Schritte, die auf die Belichtung der Membransuspension folgten, wurden bei Tageslicht durchgeführt. Die Stäbchenaußensegmente wurden in isotonem Puffer 4 (20 mM BTP, 120 mM KCl, 0,2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, eine Tablette Complete auf 250 ml (Proteaseinhibitorgemisch, Roche), pH 6,9) resuspendiert, so dass sich eine Proteinkonzentration von 4 mg Rhodopsin/ml ergab. Diese Suspension wurde auf Eis homogenisiert (Glas-Glas-Homogenisator) und mit Puffer 4 auf eine Proteinkonzentration von 1 mg Rhodopsin/ml verdünnt. Nach Zugabe von MgCl₂ (5 mM) folgte eine Zentrifugation (48400 g, 4 °C, 20 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in hypotonem Puffer 5 (5 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 6,9) resuspendiert

(4 mg Rhodopsin/ml). Nach erneutem Homogenisieren und Verdünnen (1 mg Rhodopsin/ml) wurde die Suspension belichtet (Orangefilter OG-550, 10 min, RT). Dadurch bindet Transducin an den aktivierten Photorezeptor. Die PDE löst sich aufgrund der geringen Ionenstärke des Puffers von den Membranen und kann durch Zentrifugation (95000 g, 4 °C, 30 min) abgetrennt werden. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (156000 g, 4 °C, 30 min), um restliche Membranbestandteile zu entfernen. Die PDE wurde mittels Ultrafiltration (Amicon YM 30, ca. 4 bar) bei 4 °C eingeengt. Das Pellet der belichteten Suspension wurde erneut mit Puffer 5 resuspendiert und die beiden Zentrifugationsschritte zur PDE-Abtrennung und die Ultrafiltration wiederholt. Die aus beiden Schritten gewonnenen Proben wurden vereinigt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit Hilfe eines Proteinbestimmungsreagenz (BioRad) bestimmt und die Reinheit des Präparates mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die chromatographische Aufreinigung der PDE erfolgte an einer TSK-Heparin-Säule (siehe 2.1.3.1).

Wie bereits erwähnt, ist Transducin durch die Belichtung der Diskmembranen am aktivierten Rezeptor gebunden. Durch die Aktivierung der Transducin α -Untereinheit ($Gt\alpha$) in Anwesenheit von GTP kommt es sowohl zur Dissoziation von Transducin vom aktivierten Rezeptor als auch zum Zerfall von Gt in die Untereinheiten $Gt\alpha$ und $Gt\beta\gamma$. Daher wurde das Pellet (2. Zentrifugation nach Belichtung) in hypotonem Puffer 5 mit GTP/MgCl₂ (150 μ M/500 μ M) resuspendiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis folgte die Trennung der Transducin-Untereinheiten von den Membranen durch Zentrifugation (95000 g, 4 °C, 30 min). In Analogie zur PDE wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (156000 g, 4 °C, 30 min). Die Inkubation mit GTP und die nachfolgenden Schritte wurden wiederholt. Die beiden Überstände dieser Extraktion wurden vereinigt, das Volumen mittels Ultrafiltration (Amicon YM 10, ca. 2,5 bar) reduziert und die Proteidlösung zur Entfernung der Nukleotide mit Puffer 6 (20 mM BTP, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 7,5) gewaschen. Dem schlossen sich eine Zentrifugation (150000 g, 4 °C, 15 min) und die Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford) an. Die so erhaltene Proteidlösung enthielt die Untereinheiten $Gt\alpha$ und $Gt\beta\gamma$, welche in einem weiteren Schritt chromatographisch aufgetrennt wurden (siehe 2.1.3.2).

2.1.3.1 Aufreinigung der PDE

Zur Trennung der PDE von anderen Proteinen der Stäbchenaußensegmente, folgte eine Aufreinigung mit Hilfe einer FPLC-Anlage (*fast performance liquid chromatography*) der Firma Amersham Pharmacia Biotech an einer TSK-Heparin-Säule. Die PDE erhielt man durch Elu-

tion mit einem linearen Salzgradienten (100–600 mM NaCl in Puffer 6). Das erhaltene Eluat wurde auf die gewünschte Konzentration eingeeengt (Centricon 30000). Um die Stabilität der PDE während der Lagerung bei -40 °C zu verbessern, wurde der Proteinlösung Glycerin zugesetzt (20 %).

Bevor die PDE in den Experimenten eingesetzt werden konnte, wurde das Glycerin mittels Gelfiltration (Superdex 200) entfernt. Durch Zentrifugation in einem Centricon-Röhrchen erfolgte die Einstellung der im Versuch benötigten Konzentration. Die so gewonnene PDE wurde entweder sofort im Versuch eingesetzt oder maximal drei Tage auf Eis gelagert.

2.1.3.2 Auftrennung der Transducin-Untereinheiten

Die Auftrennung von Transducin in seine Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ erfolgte nach Vorlage von Heck und Hofmann (2001). Transducin wurde dazu an Blue-Sepharose (HiTrap Blue, Amsterdam Pharmacia Biotech) gebunden. Mit dem Puffer 6 eluierte zunächst der inaktive $G\beta\gamma$ -Komplex. Die Elution des aktiven $G\beta\gamma$ -Komplexes erfolgte mit einem linearen Salzgradienten (0–0,3 M NaCl) und die der $G\alpha$ -Untereinheit mit 1 M NaCl. Die getrennten Untereinheiten wurden gegen Puffer 2 (mit 2 mM DTT) dialysiert und anschließend mittels Ultrafiltration (Amicon YM 10) eingeeengt. Nach der Konzentrationsbestimmung (nach Bradford) wurden die Proteinlösungen bei -40 °C eingefroren.

2.1.4 Präparation unilamellarer Vesikel

Als LUV (*large unilamellar vesicle*) werden große Lipidvesikel mit nur einer Membranschicht und einem Durchmesser von 100 bis 1000 nm bezeichnet. Für deren Herstellung wurden die in Chloroform gelösten Lipide in ein Reagenzglas überführt. Bei einem Gemisch aus mehreren Lipidsorten wurden zusätzlich ca. 200 μ l Chloroform zugesetzt und sorgfältig gerührt, um eine Durchmischung zu gewährleisten. Das Verdampfen des Chloroforms erfolgte mit Hilfe von Stickstoff, wobei das Reagenzglas fortlaufend gedreht wurde. Durch die Rotation wurde ein möglichst dünner Lipidfilm erhalten. Es folgte eine zweistündige Inkubation unter Vakuum, um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen. Der trockene Lipidfilm wurde in einem definierten Volumen Puffer 2 gelöst, so dass die gewünschte Lipidkonzentration erreicht wurde. Nach mehrfachem Mischen folgten fünf Gefrier-Tau-Zyklen, welche unilamellare Vesikel erzeugten. Dabei wurde die Lipidsuspension mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf -196 °C abgekühlt und anschließend im Wasserbad wieder auf 50 °C erwärmt. Eine einheitliche Vesikelgröße wurde mit elf Durchgängen durch einen Handextruder (Avestin)

mit einem Filter der Porengröße 200 nm (wenn nicht anders angegeben) erreicht. Die so präparierten LUV wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von maximal zwei Tagen verwendet.

2.2 Auftrennung der nativen Diskmembranen in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt mittels Dichtezentrifugation

Entlang des Stäbchenaußensegmentes existiert ein Cholesterolgradient. Diskmembranen am basalen Ende des Außensegmentes haben einen sechsmal höheren Cholesterolgehalt als am apikalen Ende (Boesze-Battaglia et al., 1989). Boesze-Battaglia et al. zeigten 1989, dass sich die Diskmembranen mittels Dichtezentrifugation in Abhängigkeit von ihrem Cholesterolgehalt auftrennen lassen. Dabei verwendeten sie Digitonin, ein Glykosid aus der Gruppe der Saponine, welches an Cholesterol im Verhältnis 1:1 bindet (Nishikawa et al., 1984).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Diskmembranen in Puffer 2 (30 bzw. 60 µM Rhodopsin) mit Digitonin eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei die Digitoninkonzentration der Cholesterolmenge der Diskmembranen entsprach bzw. dem 1,5fachen. Die Digitonininkubation wurde bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (6,0 bzw. 7,4).

Nach der Inkubation erfolgte das Aufschichten der Membransuspension auf kontinuierliche Saccharosegradienten. Diese wurden mit Hilfe eines Gradientenformers (Bio Rad Modell 385) gegossen und umfassten einen Saccharosebereich von 0 % bis 50 % in Aqua dest.. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 52000-72000 g, wobei die Zeit von anfänglich acht Stunden in späteren Versuchen auf vier Stunden verringert wurde. Die einzelnen Fraktionen der Membranbande wurden mit einer Pipette von oben entnommen und zur quantitativen Analyse der Lipidzusammensetzung (2.4) weiter untersucht.

2.3 Modifikation des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen

2.3.1 Herstellung von Cholesterol-Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexen

Um Membranen mit Cholesterol zu beladen, kann man Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) als Transporthilfsmittel verwenden. Dabei handelt es sich um ein zyklisches Oligosaccharid, welches aus sieben Glukoseeinheiten aufgebaut ist (siehe Abbildung 9). Dieser Ring formt einen hydrophoben Innenraum mit einem Durchmesser von ca. 0,78 nm (Szejtli, 1998), in welchen kleinere hydrophobe Moleküle eindringen können. Cholesterol kann einen Komplex mit zwei MβCD-Molekülen bilden (Nishijo et al., 2003).

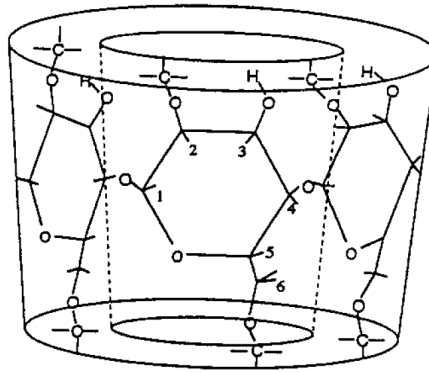


Abbildung 9: Struktur von 2,6-Di-O-Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)

Grafik: aus Nishijo et al. (2003)

Die Herstellung dieser Cholesterol-MβCD-Komplexe erfolgte nach einer Vorlage von Casseira et al. (2002). Dafür wurden 4 mg Cholesterol in Isopropanol in einen Rundkolben gefüllt und das Lösungsmittel an einem Rotationsverdampfer (Vacuubrand CVC 2, Heidolph VV micro) entfernt. Das Lösen des Lipidfilms erfolgte durch Zugabe von 3 ml 20 mM 2,6-Di-O-Methyl-β-Cyclodextrin-Lösung in Puffer 3. Das Gemisch wurde gerührt und danach für zwei Minuten im Ultraschallbad behandelt. Es schloss sich eine Inkubation bei 37 °C über Nacht unter kontinuierlichem Rühren an. Nachdem sich der Lipidfilm vollständig im MβCD gelöst hat, folgte eine Zentrifugation (2700 g, 10 min, 4 °C), um mögliche Cholesterolkristalle von den Cholesterol-MβCD-Komplexen zu trennen. Der Überstand wurde durch einen Nucleopore-Filter (Porengröße 0,2 µm) gefiltert und bei 4 °C aufbewahrt. Der Cholesterolgehalt der Komplexe wurde mit Hilfe einer Cholesterolbestimmung ermittelt (siehe 2.4.3).

2.3.2 Beladung mit bzw. Entzug von Cholesterol

Der Cholesterolgehalt von Diskmembranen sollte verändert werden. Um dies zu erreichen, wurden Diskmembranen mit den entsprechenden Mengen an zufällig methylierten β-Cyclodextrin (*randomly methylated-β-Cyclodextrin*, randMβCD, Entzug) bzw. Cholesterol-MβCD-Komplexen (Beladung) inkubiert. Dabei betrug die Rhodopsinkonzentration der Diskmembranen 10 µM. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Nutator folgten zwei Zentrifugationen (51000 g, 10 min, 4 °C), um MβCD/randMβCD bzw. nicht eingebautes/entzogenes Cholesterol zu entfernen. Die erhaltenen Pellets wurden in Puffer 3 resuspendiert und die Rhodopsinkonzentration am Spektrometer bestimmt. Anschließend

wurden diese Membranen sofort im Versuch verwendet. Zur Bestimmung des Cholesterol- und Phospholipidgehaltes wurden die unter 2.4 beschriebenen Methoden verwendet.

2.4 Analytische Bestimmung der Lipide

2.4.1 Lipidextraktion

Um die Phospholipide von Diskmembranen quantitativ bestimmen zu können, mussten diese vorher von den restlichen Membranbestandteilen getrennt werden. Dies erfolgte durch eine Lipidextraktion nach der modifizierten Vorlage von Bligh und Dyer (1959).

Die zu untersuchende Probe sollte einen Wassergehalt von mindestens 80 % haben. Dafür wurde die Probe mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Chloroform-Methanol-Lösung (1:2, v:v) im Volumenverhältnis von 1:3,75 bezogen auf das Volumen der wässrigen Probe (Anfangsprobe). Diese Mischung wurde eine Minute gerührt und danach eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Damit es zu einer Phasentrennung zwischen Lipidphase und polarer Phase kam, wurde erst Chloroform und anschließend 40 mM Essigsäure zugegeben, jeweils das 1,25-fache Volumen der wässrigen Anfangsprobe. Nach jeder einzelnen Zugabe erfolgte eine Mischung (30 Sekunden) des Ansatzes. Die anschließende Zentrifugation (1000 g, 10 min, 4 °C) beschleunigte die Phasentrennung. Es folgte die Abnahme und Überführung der unteren Phase, welche das in Chloroform gelöste Lipid enthielt, mittels einer Glaspipette in ein neues Reagenzglas. Um sicherzustellen, dass die Lipide vollständig extrahiert wurden, erfolgte die Zugabe von Chloroform zum restlichen, polaren Ansatz (mindestens das doppelte Volumen der Anfangsprobe). Nach einer Minute rühren, wurde erneut zentrifugiert (1000 g, 10 min, 4 °C) und die beiden Phasen mit Hilfe einer Glaspipette getrennt. Die beiden Chloroformphasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel mit Stickstoff in einem Probenkonzentrator (Techne Sample Concentrator mit Dri-Block® DB 3A) abgedampft. Der trockene Lipidfilm wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -40 °C eingefroren.

2.4.2 Phosphatbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Phospholipide von Diskmembranen erfolgte vom trockenen Lipidfilm im Anschluss an die Lipidextraktion mittels Phosphatbestimmung nach Vorlage von Böttcher et al. (1961). Diese Methode beruht auf der quantitativen Bildung eines Phosphomolybdänsäurekomplexes. Nach Reduktion zu Phosphomolybdänblau durch Askor-

binsäure weist dieser ein Absorptionsmaximum bei 820 nm auf und kann spektroskopisch bestimmt werden.

Zunächst wurden 400 µl einer 72 %igen Perchlorsäure auf den Lipidfilm gegeben, gemischt und im Heizblock inkubiert (45 min, 185 °C, Dri-Block® DB 3A). Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 4 ml einer 1,8 mM Ammoniummolybdatlösung zugegeben und die Mischung erneut kurz gerührt. Es folgte die Zugabe von 500 µl 10 %iger Ascorbinsäure und eine weitere Inkubation (10 min, 100 °C). Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit einem Phosphatstandard ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung) durchgeführt.

2.4.3 Cholesterolbestimmung

Der Cholesterolgehalt von Diskmembranen wurde durch Cholesterobeladung bzw. -entzug verändert. Zur Bestimmung des jeweiligen Cholesterolgehaltes wurde ein Cholesterol-Farbtest (r-biopharm) verwendet. Dabei wird das Cholesterol in der Membran durch die Cholesteroloxidase zu Cholestenon oxidiert und Wasserstoffperoxid entsteht als Nebenprodukt. Dieses oxidiert Methanol zu Formaldehyd, welches wiederum mit Acetylaceton in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen zu einem Lutidinfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm reagiert. Dieser Farbstoff kann mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie quantitativ bestimmt werden, wofür eine Kalibrierung mit einem Cholesterolstandard durchgeführt wurde.

2.5 Kalorimetrische Charakterisierung von Diskmembranen mit verändertem Cholesterolgehalt

In der Thermodynamik unterscheidet man Prozesse danach, ob sie spontan ablaufen (exergon) oder nicht (endergon) bzw. ob Energie aufgenommen (endotherm) oder abgegeben (exotherm) wird. Auch ein endothermer Prozess kann spontan ablaufen. Dieser Zusammenhang wird in der Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschrieben: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Darin ist ΔG die Änderung der freien Enthalpie, ΔH die Änderung der Reaktionsenthalpie, T die Temperatur und ΔS die Änderung der Entropie. Nimmt also die Entropie durch den abgelaufenen Prozess zu, und ist diese Zunahme größer als die Änderung der Reaktionsenthalpie durch die aufgenommene Wärme, läuft der Prozess spontan ab.

Die quantitative Bestimmung von aufgenommenen oder abgegebenen Wärmemengen ermöglicht die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Mit ihrer Hilfe werden Bindungsprozesse bei konstanter Temperatur beobachtet, wodurch thermodynamische Parameter wie Bindungs-

wärmen oder Verteilungskoeffizienten bestimmt werden können. Dazu erfolgen aufeinanderfolgende Injektionen einer flüssigen Probe (zum Beispiel ein Rezeptor) aus einer Spritze in eine Kalorimeterzelle (die im Falle des Rezeptors mit dem Liganden gefüllt ist). Die Injektion stört das thermische Gleichgewicht in der Kalorimeterzelle. Die Kontrolle der konstanten Temperatur geschieht über einen steten Temperaturvergleich zwischen der Kalorimeterzelle und einer Referenzzelle, welche mit dem Lösungsmittel gefüllt ist, welches sich auch in der Kalorimeterzelle befindet. Daher muss der Kalorimeterzelle entweder Energie zugeführt (endothermer Prozess) bzw. entzogen (exothermer Prozess) werden, um die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Zellen zu minimieren. Diese Wärmekompensation wird als Funktion der Zeit für jede einzelne Injektion gemessen. Erst wenn sich wieder ein thermisches Gleichgewicht zwischen den beiden Zellen eingestellt hat, folgt die nächste Injektion.

Alle ITC-Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten an einem VP ITC-Kalorimeter von MicroCal unter Rotlichtbedingungen. Die verwendeten Lösungen wurden vor Beginn der Messung entgast, um Luftblasen während der Messung zu verhindern. Diese können das Gleichgewicht zwischen Kalorimeter- und Referenzzelle stören, was eine instabile Grundlinie zur Folge hätte. Die Extraktion von Cholesterol aus Diskmembranen in Cholesterol-M β CD-Komplexe wurde nach Vorlage von Tsamaloukas et al. (2005) mit Abwandlungen durchgeführt. Nachdem die temperierte Kalorimeterzelle (25 °C) mit einer 5 mM randM β CD-Lösung befüllt worden war, wurde das Gleichgewicht zwischen Kalorimeter- und Referenzzelle durch das Erreichen einer stabilen Grundlinie abgewartet. Diskmembranen (100 μ M Rhodopsin in Puffer 3) wurden in die Spritze gefüllt. Das Injektionsprotokoll sah wie folgt aus: 1 x 1 μ l, 1 x 5 μ l, 3 x 10 μ l und 13 x 20 μ l, wobei die kleineren Volumina zu Beginn der Titration einer besseren Auflösung der resultierenden Titrationskurve dienten. Nach jeder Injektion wurde die resultierende Wärmeänderung so lange aufgezeichnet bis die Grundlinie wieder erreicht wurde, d.h. das System ein Gleichgewicht erreicht hatte. Diese Zeiten bis zum Gleichgewicht reichten von zehn Minuten bei Diskmembranen mit verringertem Cholesterolgehalt bis zu 30 Minuten bei Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt.

2.6 Elektronenspinresonanz

2.6.1 Theoretische Grundlagen

Bei der Elektronenspinresonanz (ESR) absorbieren paramagnetische Substanzen in einem Magnetfeld Energie in Form von Mikrowellenstrahlung. Paramagnetische Substanzen verfü-

gen über ein permanentes magnetisches Moment $\vec{\mu}$ eines ungepaarten Elektrons. Zusätzlich zur Masse und Ladung besitzen Elektronen einen Gesamtdrehimpuls \vec{J} . Dieser setzt sich aus dem Bahndrehimpuls \vec{L} und dem Eigendrehimpuls \vec{S} , dem Spin, zusammen. Der Bahndrehimpuls kann jedoch bei organischen Radikalen vernachlässigt werden (Winter und Noll, 1998). Das magnetische Moment eines freien Elektrons $\vec{\mu}_s$ ist gegeben durch:

$$\vec{\mu}_s = -\frac{g \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot \vec{S} \quad 2-1$$

wobei μ_B das Bohrsche Magneton, \hbar das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum und g der gyromagnetische Faktor ist. Bringt man ein Elektron in ein homogenes magnetisches Feld mit der Flussdichte \vec{B}_0 , so kommt es zu einer Aufspaltung der zuvor entarteten Energiezustände. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker als Zeeman-Effekt bezeichnet (Abbildung 10).

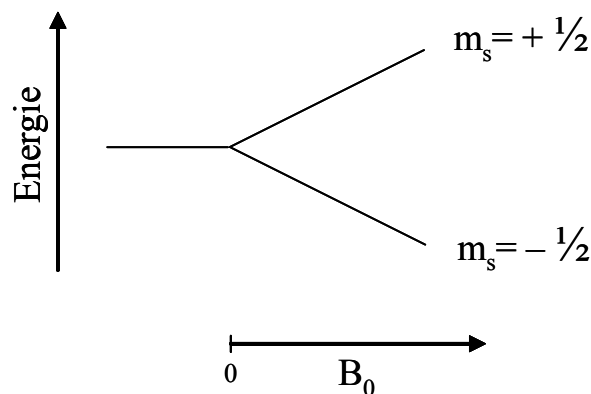


Abbildung 10: Zeeman-Effekt

Aufspaltung der entarteten Energiezustände eines Elektronenspins durch ein äußeres Magnetfeld \vec{B}_0 . (m_s magnetische Spinquantenzahl). Grafik: aus Winter und Noll (1998) modifiziert

Der Spin \vec{S} richtet sich im Magnetfeld entweder parallel oder antiparallel zur Magnetfeldrichtung aus. Für die Spinquantenzahl $S = 1/2$ ergeben sich somit die magnetischen Quantenzahlen $m_s = +1/2$ und $m_s = -1/2$. Diese Energiezustände besitzen die Energie $E_{\pm} = g \cdot \mu_B \cdot \vec{B}_0 \cdot m_s$. Folglich kann es zur Absorption kommen, wenn dem System eine Energiedifferenz von $\Delta E = g \cdot \mu_B \cdot \vec{B}_0 = h \cdot \nu$ in Form von elektromagnetischer Strahlung zugeführt wird, wobei es zu einem Übergang von E_- zu E_+ kommt. In der ESR werden Feldstärken von 0,1 bis 1 Tesla verwendet, dies entspricht der Frequenz von Mikrowellen. Bei den, in dieser Arbeit, verwen-

deten Spinsonden (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) interagiert der Elektronenspin zusätzlich mit dem Kernspin des benachbarten Stickstoffatoms. Da dieser die Kernspinquantenzahl $I = 1$ aufweist, führt diese Wechselwirkung zu $2I+1$ Aufspaltungen der beiden Energieniveaus, und somit zu einem Absorptionsspektrum mit drei Linien (siehe Abbildung 11). Diese Wechselwirkung mit dem benachbarten Kernspin wird als Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet und durch die Hyperfeinwechselwirkungskonstante a beschrieben. Sie gibt den Abstand der Linien in Tesla an und enthält strukturelle Aussagen über das Radikal.

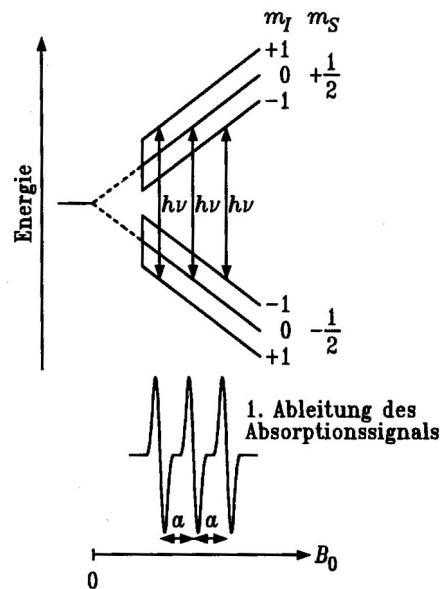


Abbildung 11: Hyperfeinaufspaltung der Energieniveaus und das dazugehörige ESR-Signal

Durch Wechselwirkung des Elektronenspins ($S = \frac{1}{2}$) mit einem Kernspin ($I = 1$) kommt es zur Aufspaltung der Energieniveaus. Das resultierende ESR-Spektrum besteht aus drei Linien. Grafik aus: Winter W. und Noll F. (1998) in *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Seite 467

Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen, wird das Absorptionssignal moduliert. Das daraus resultierende Spektrum ist die erste Ableitung des Absorptionssignales. Aus diesem Signal kann man sowohl quantitative als auch qualitative Informationen gewinnen. Quantitative Aussagen können getroffen werden, indem man das Spektrum doppelt integriert. So können Informationen über die Menge der Spinsonden in verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Die Spektrenform dagegen liefert Auskünfte über die Beweglichkeit der Spinsonde und über ihre Umgebung.

2.6.2 Ascorbat-Reduktionsmethode

Zur Untersuchung der Verteilung und Beweglichkeit des Cholesterols in Diskmembranen wurden drei verschiedene spinmarkierte Cholesterolanaloga verwendet, SL-Cholesterol (SL-Chol), SL-Cholestan (SL-C) und SL-Androstan (SL-A). Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur (Abbildung 12) bezüglich der Bindungsstelle der Spingruppe und, im Fall von SL-Androstan, durch das Fehlen der Fettsäurekette. Durch Zugabe von Ascorbat wird die Spingruppe dieser Moleküle reduziert, so dass kein Signal in ESR-Messungen vorhanden ist.

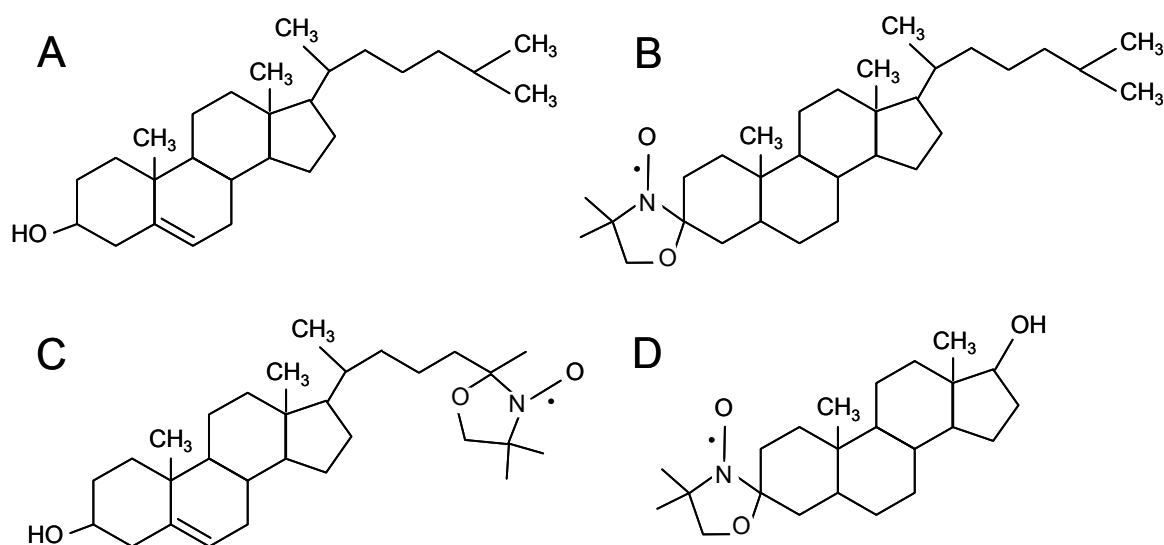


Abbildung 12: Vergleich der chemische Struktur von nativem Cholesterol mit den spinmarkierten Sterolanaloga

A natives Cholesterol; **B** SL-Cholestan (SL-C); **C** SL-Cholesterol (SL-Chol); **D** SL-Androstan (SL-A). Grafik: aus Scheidt et al. (2003) und modifiziert

2.6.2.1 Einbau von spinmarkierten Cholesterolanaloga in Diskmembranen

Die in Chloroform gelösten Spinsonden (1 mM) wurden in ein Reagenzglas überführt, das Chloroform mit Stickstoff abgedampft und anschließend die Cholesterol- und Cholestan-Spinsonden in einer 5 mM M β CD-Lösung gelöst, so dass eine Sondenkonzentration von 120 μ M eingestellt wurde. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe der Spinsonden-M β CD-Mischung zur Diskmembransuspension (43 μ M Rhodopsin) für weitere zehn Minuten.

Die Androstan-Spinsonde wurde mit 5 μ l Ethanol angelöst und durch Zugabe von Puffer 3 eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Sonde zur

Membransuspension. Nach zehnmütiger Inkubation der Spinsonden-Membransuspension bei Raumtemperatur wurde die SL-Androstan-Membransuspension zentrifugiert (51000 g, 4 °C, 10 min), um nichteingebaute Spinsonden zu entfernen.

Die Ansätze mit SL-C und SL-Chol, welche M β CD enthielten, wurde ein zweites Mal zentrifugiert, um eine vollständige Entfernung des M β CD sicherzustellen. Die Spinsondenkonzentration betrug 0,3 bis 0,8 mol% bezogen auf die Lipidkonzentration der Diskmembranen.

2.6.2.2 Reduktion der Cholesterolsinsonden - ESR-Messung

Die Reduktion der Spinsonden erfolgte durch Zugabe von 50 mM Askorbat bzw. 17 mM 6-O-Phenylaskorbat zu einem vortemperierten Aliquot der Sonden-Membransuspension (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4). Unmittelbar nach Zugabe wurde die Suspension in ein vortemperiertes ESR-Röhrchen überführt und die Spektren am ESR-Gerät (Bruker ECS 106 Spektrometer) aufgezeichnet. Dabei wurde die Abnahme des Niedrigfeldpeaks über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten verfolgt. In den ersten sieben Minuten erfolgte ca. alle 40 Sekunden die Aufzeichnung eines Spektrums des Niedrigfeldpeaks. Nach zehn Minuten wurden die Messabstände auf fünf Minuten verlängert. Die Reduktion erfolgte bei 4 °C bzw. bei 10, 16, 20, 25, 30 und 35 °C. Die Temperatur wurde am ESR-Gerät über eine Temperaturregung auf 0,2 °C genau eingestellt.

2.6.2.3 Unilamellare POPC-Vesikel mit spinmarkierten Lipiden

Große unilamellare Vesikel aus 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (POPC) und SL-Cholestan bzw. spinmarkiertem Phosphatidylcholin (SL-PC) (siehe 2.6.3) wurden hergestellt, um die Verteilung der spinmarkierten Lipide mittels Askorbatreduktion zu untersuchen. Dazu wurde das in Chloroform gelöste POPC und SL-C bzw. SL-PC in ein Reagenzglas überführt und gemischt. Das Verhältnis von Phospholipid zu Spinsonde betrug 100:1 (mol:mol). Durch Zugabe von Puffer 2 zum trockenen Lipidfilm wurde eine POPC-Konzentration von 4 mM eingestellt. Die Präparation der Vesikel erfolgte wie unter 2.1.4 beschrieben.

2.6.3 BSA-Extraktionsmethode

2.6.3.1 Extraktion von spinmarkierten Phospholipiden durch BSA aus Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipiden (SL-PL) aus Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde mit den drei häufigsten Phospholipiden der Diskmembran Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin untersucht. In Abbildung 13 ist die chemische Struktur dieser Phospholipidanaloga dargestellt.

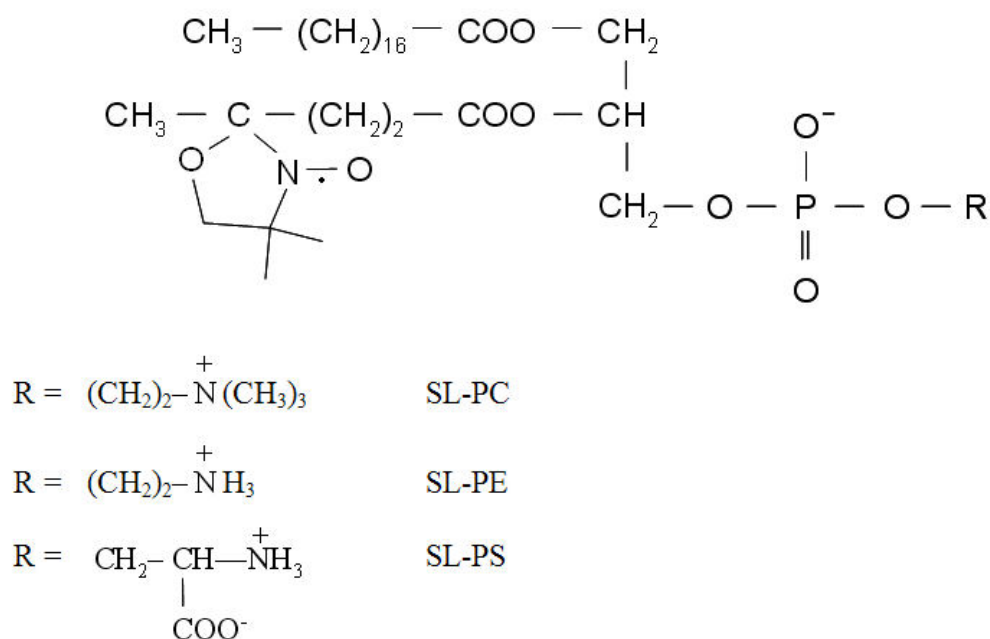


Abbildung 13: Chemische Struktur der spinmarkierten Phospholipidanaloga (SL-PL)

Die spinmarkierten Phospholipide besitzen eine langkettige Fettsäure an der sn 1-Position und eine kurzkettige Fettsäure an der sn 2-Position, an die die Spinsonde (eine Doxylgruppe, 2,2-disubstituierte 4,4-Dimethyl-3-oxazolidinyloxy-Gruppe) kovalent gebunden ist. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Kopfgruppe (R).

Die Phospholipidanaloga wurden in Chloroform gelöst und als Stammlösung bei -40 °C gelagert. Um sie in Diskmembranen einzubauen, wurden sie in ein Reagenzglas überführt und das Lösungsmittel mit Hilfe von Stickstoff verdampft. Anschließend wurde Puffer 3 zu dem trockenen Lipidfilm gegeben, so dass sich eine Spinsondenkonzentration von 100 µM ergab. Der Einbau der Phospholipidspinsonden in die innere Lipidschicht der Diskmembranen wurde zeitabhängig verfolgt, wobei die Zugabe der Spinsonden zur Diskmembransuspension (30 µM Rhodopsin in Puffer 3 mit 1 mM ATP, 1 mM PMSF, pH 7,4, 20 °C) den Startpunkt des Einbaus markierte. Zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Ergebnisse) wurden 50 µl Aliquots

der Spinsonden-Membransuspension entnommen, mit 25 µl eisgekühlter 10 %iger BSA-Lösung vermischt und eine Minute auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (51000 g, 2 min, 4 °C) wurde der Überstand vom Pellet getrennt, letzteres in Puffer 3 resuspendiert und bis zur Vermessung am ESR-Spektrometer bei -40 °C eingefroren.

2.6.3.2 Einfluss der Phosphodiesterase auf die Extrahierbarkeit der Phospholipidanaloga

Der Einfluss der Phosphodiesterase auf die Extrahierbarkeit der Phospholipidanaloga SL-PC und SL-PE wurde nach der Vorlage von Hessel et al. (2003) untersucht. Dafür wurde eine Spinsonden-Membransuspension wie unter 2.6.2 beschrieben hergestellt, d.h. Diskmembranen (30 µM Rhodopsin in Puffer 3 mit 1 mM ATP, 1 mM PMSF, pH 7,4) mit SL-PC bzw. SL-PE (30 µM) bei 20 °C vermischt. Dieser Spinsonden-Membransuspension (1100 µl) wurden 30 Minuten nach Spinsondenzugabe 500 µl entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Die weitere Inkubation der beiden Ansätze erfolgte unter identischen Bedingungen (20 °C) und 50 µl Aliquots wurden nach 50 und 60 Minuten (nach Spinsondenzugabe) entnommen, mit 25 µl eisgekühlter 10 %iger BSA-Lösung vermischt, eine Minute auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Nach 60 Minuten wurde dem zweiten Ansatz Phosphodiesterase (1 µM) zugegeben und in fünfminütigen Abständen Aliquots entnommen. Die Aliquotentnahme aus der Spinsonden-Membransuspension ohne PDE erfolgte in zehnminütigen Abständen.

2.6.3.3 Quantitative Analyse der ESR-Spektren nach BSA-Extraktion

Die quantitative Bestimmung der Spinsondenmengen in den Proben der Extraktionsexperimente erfolgte an einem ESR-Spektrometer (Bruker ECS 106 Spektrometer) bei Raumtemperatur. Dafür wurde den Aliquots Kaliumhexacyanoferrat (10 mM) zugegeben, um reduzierte Doxyl-Gruppen zu reoxidieren. Nach Aufnahme der Spektren [Center field: 3362 G, Modulationsfrequenz: 100 kHz, Modulationsamplitude: 2,55 G (Überstand) bzw. 4,01 G (Pellet)] wurde der Mittelfeldpeak vermessen und das Doppelintegral des Spektrums bestimmt. Zur Berechnung der prozentualen Spinsondenanteile in der Membran wurden Aliquots aus der Spinsonden-Membransuspension entnommen und vermessen. Für den BSA-gebundenen Spinsondenanteil wurde die Spinsondenlösung direkt zur BSA-Lösung gegeben. Die mit Hilfe dieser Bezugswerte berechneten prozentualen Anteile der Spinsonden in der Membran bzw. der BSA-Lösung wurden gegen die Zeit aufgetragen. Daraus ergab sich der zeitlicher Verlauf der Einwärtsbewegung der Spinsondenmoleküle in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt bzw. zusätzlich der Einfluss der Phosphodiesterase.

2.6.4 Analyse der Bewegungsparameter der ESR-Spektren

In den theoretischen Grundlagen der ESR wurde bereits darauf eingegangen, dass aus einem ESR-Spektrum auch Aussagen über die Beweglichkeit der Spinsonde in seiner Umgebung getroffen werden können. Die dafür verwendeten Parameter sind zum einen der Ordnungsparameter S und zum anderen die Rotationskorrelationszeit τ_R . Der Ordnungsparameter S berechnet sich aus dem Verhältnis der beobachteten ($a_{||} - a_{\perp}$) Hyperfeinanisotropie zur maximalen ($a_{zz} - a_{xx} = (a_{||} - a_{\perp})_{\max} \approx 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ T}$):

$$S = \frac{(a_{||} - a_{\perp})_{\text{beob.}}}{(a_{||} - a_{\perp})_{\text{max.}}} \quad 2-2$$

Somit ist $S = 1$ für starre Moleküle und $S = 0$ für eine isotrope, schnelle molekulare Bewegung. Die Rotationskorrelationszeit τ_R beschreibt die Zeit, in der der Anteil $1/e$ der Moleküle, welche um einen bestimmten Winkel aus ihrer Ausgangslage gedreht wurden, wieder die Ausgangslage erreichen. Sie lässt sich über die empirische Beziehung:

$$\tau_R = 6,5 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \quad 2-3$$

berechnen, mit ΔB_0 = Linienbreite der Mittelfeldlinie, h_0/h_{-1} = Intensitätsverhältnis der mittleren zur Hochfeldlinie.

Zur Bestimmung dieser beiden Parameter, wurde die Spinsonde entsprechend (2.6.2.1) in die Membran eingebaut und bei Temperaturen von 4-35 °C im ESR-Gerät vermessen. Die ESR-Spektren (Center field: 3362 G, Modulationsfrequenz: 100 kHz, Modulationsamplitude: 2 G) wurden mindestens viermal akkumuliert, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

2.7 UV/Vis-Spektroskopie zur Bestimmung von Rhodopsin und seinen Photointermediaten

2.7.1 Konzentrationsbestimmung von Rhodopsin

Rhodopsin ist der Lichtrezeptor der Stäbchenzelle und nimmt in Diskmembranen den größten Anteil der Proteine ein. Das molare Verhältnis von Phospholipiden zu Rhodopsin beträgt etwa 70:1 (Daemen, 1973). Somit ist es möglich die Phospholipidkonzentration der Diskmembransuspension über eine absorptionsspektroskopische Bestimmung der Rhodopsinkonzentration zu ermitteln. Um eine starke Streuung des Messlichtes an den Diskvesikeln zu vermeiden, wurden die Membransuspensionen mit 3 %igem Lauryldimethylaminoxid (LDAO) in Puffer 2 solubilisiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 498$ nm an einem UV/Vis-Spektrometer (Cary 50 Bio, Varian) vermessen. Darauf folgte eine Belichtung der Probe (15 s) mit einer Kaltlichtquelle ($\lambda > 480$ nm, Schott GG 495) und die erneute Absorptionsbestimmung bei 498 nm. Die Differenz der Absorption der unbelichteten und belichteten Probe wurde gebildet und die Rhodopsinkonzentration bestimmt ($\epsilon_{498} = 40.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Wald und Brown, 1953).

2.7.2 Bestimmung des Meta II-Anteils in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Nach Aktivierung von Rhodopsin durch Licht erreicht der Rezeptor ein Gleichgewicht der beiden Photointermediate Metarhodopsin I (Meta I) und Metarhodopsin II (Meta II). Das Gleichgewicht hängt neben der Temperatur und dem pH-Wert auch von den Membraneigenschaften ab. Um den Einfluss des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen auf dieses Gleichgewicht zu untersuchen, wurde die Bildung von Meta II an einem modifizierten Zweiwellenlängen-Spektrometer (Shimadzu UV 3000) bei 20 °C und pH 7,4 verfolgt. Dazu wurde die Membransuspension (10 μM Rhodopsin in Puffer 3) in eine Küvette (Schichtdicke 2 mm) gefüllt und sowohl das Absorptionsmaximum von Meta II ($\lambda = 380$ nm) als auch der isobestische Punkt des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes ($\lambda = 417$ nm) zeitabhängig nach Photoaktivierung aufgezeichnet. Durch einen Lichtblitz mit einer definierten Intensität und spektraler Verteilung ($\lambda = 500 \pm 20$ nm) wurden 19 % des in der Probe enthaltenen Rhodopsins aktiviert. Aus der Differenz der beiden Wellenlängen ergab sich die von Lichtstreuungseinflüssen bereinigte Meta II-Bildung.

Führt man dieselbe Messung in Anwesenheit von Transducin durch, so stellt sich ein neues Meta I-Meta II-Gleichgewicht durch die Komplexbildung von Transducin mit Meta II zu Gunsten des Meta II ein (*Extra-Meta II*, Emeis und Hofmann, 1981). Die quantitative Bestimmung der Meta II-Menge erfolgte wie oben beschrieben, jedoch mit zusätzlicher Gabe von 1; 1,75 bzw. 3,5 μM Transducin.

Um Unterschiede im Zeitverlauf der Meta II-Bildung in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen erfassen zu können, wurden Messungen unter ähnlichen Bedingungen (5 μM Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) an einem Zweiwellenlängen-Blitzlicht-Photometer mit einer Zeitauflösung im Millisekundenbereich durchgeführt (Schleicher und Hofmann 1985). Die Absorptionsänderung bei 380 nm nach Belichtung der Probe (11 % der Rezeptoren mit Blitz aktiviert, Breitbandfilter 490 bis 540 nm) wurde mit einem digitalen Oszilloskop (Nicolet Accura 100; LDS Test and Measurements GmbH) aufgezeichnet.

Durch Bestimmung des initialen Anstieges des zeitlichen Verlaufes der Meta II-Bildung mittels linearer Regression der ersten fünf Millisekunden nach Rezeptoraktivierung wurden die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Meta II-Bildung ermittelt.

2.8 Dunkelbindung von Transducin bzw. PDE an Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

2.8.1 Zentrifugationsexperiment

Sowohl Transducin als auch die Phosphodiesterase sind periphere Membranproteine mit Lipidmodifikationen (siehe Einleitung). Diese Lipidmodifikationen können in die Membran eindringen und haben somit direkten Kontakt zur Lipidumgebung. Der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf das Bindungsverhalten der beiden Proteine an Diskmembranen ohne Lichtaktivierung des Rezeptors wurde mit einem Zentrifugationsexperiment untersucht (Heck et al., 2000). Durch das Zentrifugieren kann der membrangebundene vom löslichen Proteinanteil getrennt werden.

Dazu wurden Diskmembranen (3 μM Rhodopsin in Puffer 3) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit 0,6 μM Transducin bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vierminütiger Inkubation folgte die Zentrifugation (51000 g, 2 min, 20 °C). Anschließend wurde der Überstand entnommen und in ein neues Gefäß überführt. Das verbliebene Pellet wurde mit Puffer 3 überspült, welcher entnommen und verworfen wurde. Es folgte das Resuspendieren des Pel-

lets. Beide Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Das Bindungsverhalten der PDE wurde unter identischen Bedingungen wie unter 2.6.3.2 beschrieben ($30\text{ }\mu\text{M}$ Rhodopsin, $1\text{ }\mu\text{M}$ PDE) und zehnminütiger Inkubationszeit untersucht.

2.8.2 Quantifizierung der Dunkelbindung von Transducin und Phosphodiesterase

Die im Zentrifugationsexperiment gewonnenen Proben wurden nach einer Auftragung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) über eine densitometrische Messung quantifiziert. Die Elektrophorese wurde nach Vorlage von Lämmli (1970) im BioRad Mini-Protean® 3 Cell-System durchgeführt. Vor der Auftragung der Proben auf 12 %ige SDS-Gele erfolgte eine zehnminütige Inkubation mit Solubilisierungspuffer (Puffer 7) bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, um eine Aggregation von Rhodopsin zu erreichen, welches sonst die Proteinbande von $\text{Gt}\alpha$ und $\text{Gt}\beta\gamma$ überlagern würde (gleiche Größenordnung im Molekulargewicht). Zusätzlich zu den Proben und einem Molekulargewichtsmarker (Protein-standard mixture IV, 12–78 kDa) erfolgte die Auftragung eines Transducin- bzw. PDE-Standards, welcher die vollständige Menge des eingesetzten Proteins enthielt und einer Membranprobe ohne zugegebenes Protein. Letztere diente der Bestimmung der Hintergrundfärbung bedingt durch das in den Diskmembranen enthaltene Rhodopsin. Die mit Coomassie Blue gefärbten Gele wurden nach der Trocknung eingescannt und die Bilder mit Hilfe des Programmes TINA (Raytest Isotope Messgeräte, GmbH) ausgewertet. Die Intensitäten der Proteinbanden wurden in freien densitometrischen Maßeinheiten angegeben.

2.9 Zeitaufgelöste Lichtstreuung

In der zeitaufgelösten Lichtstreuung beobachtet man einen durch einen Auslöseimpuls (z.B. ein Lichtblitz) induzierten Prozess an Partikeln, welcher eine Änderung der Lichtstreuung dieser Partikel zur Folge hat. Im Falle der Diskvesikel, die einen Durchmesser von ca. 500 nm aufweisen (Smith et al., 1975), wird Licht im nahem Infrarotbereich (840 nm) gestreut und in einem Winkel von $\theta = 16^{\circ} \pm 2^{\circ}$ detektiert (Heck et al., 2000). Die Änderung der Lichtstreuung wird durch Bindung bzw. Dissoziation von löslichen Proteinen an bzw. von Diskmembranen ausgelöst. Die Streuung des verwendeten Lichtes durch diese kleinen löslichen Proteine in der Suspension ist zu gering. Der Einfluss auf die oben beschriebene Messung kann vernachlässigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Prozesse mit Hilfe der zeitaufgelösten Lichtstreuung untersucht. Zum einen die Bindung des löslichen Anteils von Transducin an die Diskmembran nach Aktivierung von Rhodopsin (Bindungssignal) und zum anderen die Dissoziation der aktivierten α -Untereinheit von Transducin nach Aktivierung von Rhodopsin in Anwesenheit von GTP (Dissoziationssignal) (Heck et al., 2000). Das Dissoziationssignal repräsentiert nur den Anteil des bereits im Dunkelzustand an die Diskmembran gebundenen Transducins, da die langsamere Bindung und Aktivierung des löslichen Anteils außerhalb des zeitlichen Verlaufes des Dissoziationssignals liegt. Somit können die Anteile des membran-gebunden bzw. löslichen Transducins über einen Vergleich der Amplituden beider Signale quantifiziert werden (Heck und Hofmann, 2001).

2.9.1 Messung des Bindungssignals

Die Messung des Bindungssignals erfolgte in einer 10 mm Küvette (300 μ l Probenvolumen), auf welche ein Lichtstrahl ($\lambda = 840$ nm) fokussiert wurde. Dazu wurden Diskmembranen (3 μ M Rhodopsin) mit Transducin (0,6 μ M) in Puffer 3 gemischt. Nach Aufnahme einer Grundlinie des Lichtstreusignals mit einem digitalen Oszilloskop (Nicolet 400, Madison, WI) erfolgte die Aktivierung von 32 % des Rhodopsins mit einem Lichtblitz ($\lambda = 500 \pm 20$ nm). Das Signal wurde über einen Zeitraum von 50 Sekunden aufgezeichnet. Zusätzlich zum Bindungssignal wurde das so genannte N-Signal gemessen. Dabei handelt es sich um ein Rhodopsin-spezifisches Signal, welches mit Konformationsänderungen nach Aktivierung des Rezeptors zusammenhängt (Heck et al., 2000). Das N-Signal wurde ohne Zugabe von Transducin aufgenommen und später vom Bindungssignal subtrahiert.

2.9.2 Messung des Dissoziationssignals

Um die Dissoziation der α -Untereinheit des Transducins verfolgen zu können, wurden den Diskmembranen (3 μ M Rhodopsin) zusätzlich zum Transducin (0,6 μ M) Hydroxylamin (2,5 mM) und GTP (0,5 mM) in Puffer 3 zu gegeben. Nach Aufnahme der Grundlinie wurden 0,5 % des Rhodopsins aktiviert und das Signal über einen Zeitraum von zehn Sekunden verfolgt.

Zur Kontrolle der quantitativen Bindung bzw. Dissoziation von Transducin an bzw. von Diskmembranen wurden die Proben ein zweites Mal mit den gleichen Blitzeinstellungen belichtet, um sicherzustellen, dass die gesamte Menge an Transducin bereits nach dem ersten Blitz reagiert hat.

Die Änderung der Lichtstreuung wurde als relative Intensitätsänderung (I/I_0) gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausgangsintensität (I_0) des Lichtstreusignals wurde nach Erreichen einer stabilen Grundlinie vor Belichtung der Probe bestimmt. Um kinetische Informationen der Signale zu erhalten, wurde der anfängliche Anstieg mittels linearer Regression der ersten 20 bis 30 Datenpunkte ermittelt. Dabei beschreibt das Bindungssignal die Bindungsgeschwindigkeit des löslichen Anteils von Transducin an die Diskmembran und das Dissoziationssignal die Geschwindigkeit der Transducinaktivierung.

2.10 Messung der PDE-Aktivität

Die PDE-Aktivität wurde an vollständig belichteten Diskmembranen (5 μM Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt gemessen. Die Proteinkonzentrationen betrugen 0,6 μM für Transducin und 0,05 μM für die PDE. Der Protein-Membransuspension wurden 200 μM eines durch Transducin nicht hydrolysierbaren Analogs von Guanosintriphosphat ($\text{GTP}\gamma\text{S}$) zugegeben, durch welches die aktivierten Transducin- α -Untereinheiten in ihrem aktiven Zustand verblieben. Die Messung erfolgte an einer pH-Elektrode mit angeschlossenem digitalem Oszilloskop (Nicolet 400, Madison, WI). Die Probe wurde während der gesamten Messung mittels Magnetrührer bewegt. Nach der Aufnahme der Grundlinie (ohne cGMP), wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates cGMP (3 mM) gestartet. Nach vollständigem Umsatz von cGMP stellte sich ein stabiles Plateau ein, worauf die Zugabe von 8 μl einer 0,1 N NaOH-Lösung erfolgte. Dies diente der Kontrolle der eingesetzten cGMP Konzentration, da so die Menge an gebildeten Protonen bestimmt werden konnte. Die PDE-Aktivität wurde aus der Steigung der pH-Kurve bestimmt.

2.11 Materialien

Die Rinderaugen wurden von den örtlichen Schlachthöfen bezogen. Für die Datenverarbeitung, statistische Berechnungen und Kurvenanpassung wurden die Programme SigmaPlot 2001 (SPSS Inc.) und Stat32 (SPSS Inc.) verwendet.

Neben den im Text benannten und den laborüblichen Geräten, wie Glaswaren und Pipetten, wurden folgende Zentrifugen benutzt.

Ultrazentrifuge L-70 UZ	Beckmann
Tischultrazentrifuge Optima™ TLX UZ	Beckmann
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann-Coulter
Tischzentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus Sepatech

2.11.1 Verwendete Chemikalien

Aprotinin		Roche
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol	Sigma
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma
BTP	1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methyl-amino]-propan	Fluka
DTT	1,4-Dithiothreitol	Merck
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dikaliumsalz	Fluka
Ficoll		Pharmacia
GDP	Guanosin-5'-diphosphat	Fluka
Glucose		Merck
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	Fluka
GTP γ S	Guanosin-5'-[γ -thio]triphosphat	Fluka
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LDAO	Lauryldimethylaminoxid	Calbiochem
Leupeptin		Roche
MgCl ₂		Fluka
M β CD	2,6-Di-O-Methyl- β -Cyclodextrin	Fluka
NaCl		Fluka
PMSF	Phenylmethanysulfonylfluorid	Fluka
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin	Avanti
randM β CD	<i>randomly methylated β-cyclodextrin</i>	Fluka
Saccharose		Merck
SDS	Natriumdodecylsulfat	Sigma
SL-C	spinmarkiertes Cholestan	Sigma
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	Fluka

2.11.2 Zusammensetzung der Puffer

- Puffer 1** 41 mM K_2HPO_4 , 26 mM KH_2PO_4 , 1 mM $\text{Mg}(\text{Az})$, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0,1 μM Aprotinin, 5 μM Leupeptin, 10 mM Glucose, pH 7,0
- Puffer 2** 20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4
- Puffer 3** 20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 2 % Saccharose, pH 7,4
- Puffer 4** 20 mM BTP, 120 mM KCl, 0,2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, eine Tablette Complete auf 250 ml (Proteaseinhibitorgemisch, Roche), pH 6,9
- Puffer 5** 5 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 6,9
- Puffer 6** 20 mM BTP, 1 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, pH 7,5
- Puffer 7** (5x) 290 mM Tris, 3,4 M Glycerin, 62 mM DTT, 0,35 M SDS, 0,15 mM Bromphenolblau, 50 mM EDTA, pH 6,8

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung und Beweglichkeit von Cholesterol in Diskmembranen

3.1.1 Askorbatreduktion von verschiedenen spinmarkierten Cholesterolanaloga

Die Verteilung und Beweglichkeit von Cholesterol in Diskmembranen wurde mit drei spinmarkierten Cholesterolanaloga untersucht: SL-Cholesterol (SL-Chol), SL-Cholestan (SL-C) und SL-Androstan (SL-A).

Nach dem Einbau der Cholesterolanaloga (0,3 mol% bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration) in Diskmembranen erfolgte deren Reduktion durch Askorbat. Zuerst wurde das ESR-Spektrum der Spinsonde in Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) ohne Zugabe des Reduktionsmittels aufgenommen und die Höhe des Niedrigfeldpeaks vermessen. Diese Probe diente als Referenz für die vollständige Spinsondenmenge (100 %) (schwarze Linie in Abbildung 14).

Nach Zugabe des Reduktionsmittels zu einem weiteren Aliquot der Spinsonden-Diskmembransuspension wurden ESR-Spektren zu den angegebenen Zeiten aufgenommen (farbige Linien in Abbildung 14). Um eine bessere zeitliche Auflösung des Reduktionsverlaufes in den ersten zehn Minuten zu erhalten, erfolgte nur die Registrierung des Niedrigfeldpeaks. In Abbildung 14 ist dessen Abnahme zu vier repräsentativen Zeiten (75 s, 95 s, 180 s, 25 min) am Beispiel der Askorbatreduktion von SL-C dargestellt. Nach 25 Minuten sind nahezu alle Spinsonden reduziert worden (orange Linie in Abbildung 14).

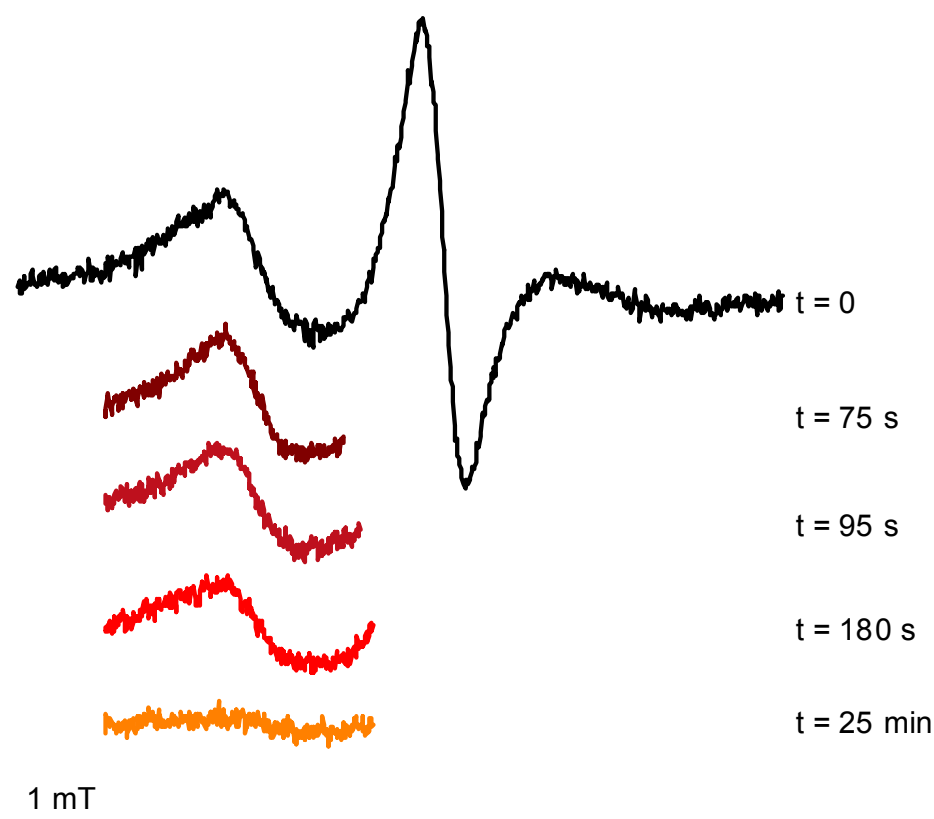


Abbildung 14: ESR-Spektren der Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen

Durch Inkubation (10 min, 20 °C) der Spinsonden-M β CD-Mischung (120 μ M SL-C) mit Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) erfolgte der Einbau von SL-C (0,8 mol%) in die Membranen. Nach zweimaliger Zentrifugation (51000 g, 4 °C, 10 min) und Resuspendieren in Puffer 3 (pH 7,4, 4 °C) wurde ein Aliquot der Sonden-Membransuspension in ein vortemperiertes ESR-Röhrchen gefüllt und das ESR-Spektrum bei 4 °C aufgenommen (schwarze Linie, 100 % Spinsondenmenge). In einem weiteren Aliquot wurde die Reduktion von SL-C durch Zugabe von Ascorbat (50 mM) gestartet und die ESR-Messung wie beschrieben durchgeführt. Es erfolgte die Aufzeichnung des Niedrigfeldpeaks, um in kurzen Zeitabständen messen zu können. Dargestellt sind die ESR-Spektren (Niedrigfeldpeak) zur Reduktion von SL-C nach 75 s (dunkelrot), 95 s (rot), 180 s (hellrot) und 1500 s (orange) nach Zugabe von Ascorbat.

Der nichtreduzierte Spinsondenanteil wurde über die Differenz zum Niedrigfeldpeak des Referenzwertes berechnet. Abbildung 15 zeigt die zeitlichen Verläufe dieser Reduktionen aller drei Spinsonden (0,3 mol%) in Diskmembranen bei 4 °C.

SL-Cholesterol (●, Abbildung 15) wird im Vergleich zu den beiden anderen Cholesterolanaloga nur gering durch das Reduktionsmittel beeinflusst. Es zeigt sich eine 30 %ige Abnahme der Höhe des Niedrigfeldpeaks im zeitlichen Verlauf des Experimentes. SL-Cholestan (▲) und SL-Androstan (■) zeigen eine höhere Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel im Ver-

gleich zu SL-Chol. Etwa 90 % der Spinsondenmenge wurden innerhalb einer halben Stunde reduziert.

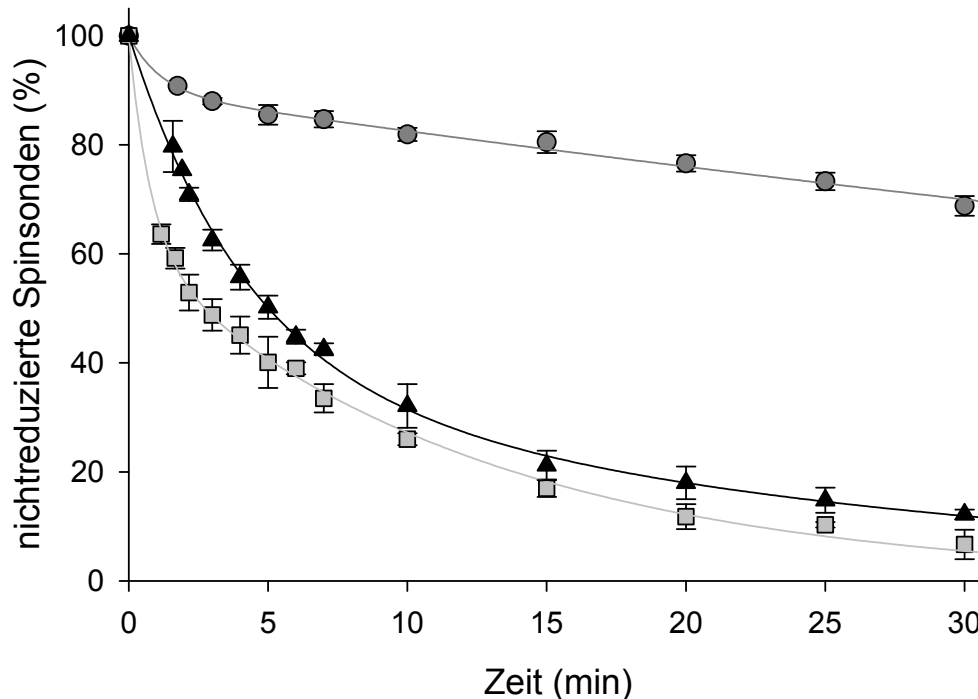


Abbildung 15: Ascorbatreduktion von spinmarkierten Cholesterolanaloge in Diskmembranen

SL-Cholesterol (●), SL-Cholestan (▲) bzw. SL-Androstan (■) wurden in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4, 20 °C) eingebaut (wie bei Abbildung 14 beschrieben). Die Spinsondenkonzentration betrug 0,3 mol% bezogen auf die Lipidkonzentration der Diskmembranen. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von Ascorbat (50 mM) bei 4 °C. Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion.

Die zeitabhängige Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums gibt Auskunft über die Zugänglichkeit der Spinsonde zum Reduktionsmittel und damit auch über deren Verteilung und Beweglichkeit in der untersuchten Membran. Die Reduktionsverläufe aller drei Cholesterolanaloge können mit biexponentiellen Funktionen beschrieben werden. Das lässt darauf schließen, dass jeweils zwei Spinsondenfraktionen existieren, die sich in ihrer Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel unterscheiden. Die berechneten Parameter dieser Funktionen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Es bleibt jedoch zu beachten, dass die Anpassung der dargestellten Daten an biexponentielle Funktionen nur einen ersten Hinweis auf den möglichen Mechanismus hinter diesem Reduktionsverlauf geben. Da alle vier Parameter der Funktion frei wählbar sind (da bisher keiner der Parameter bekannt ist), können unterschiedliche Parametersätze zu sehr ähnlichen Kurvenverläufen führen. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Richtigkeit dieser Parameter zu verifizieren und werden im Folgenden beschrieben.

Tabelle 1: Parameter der biexponentiellen Funktionen der Ascorbatreduktion von Cholesterolanalog in Diskmembranen

Die Daten der in Abbildung 15 dargestellten Reduktionsverläufe der Cholesterolanalog in Diskmembranen wurden an biexponentielle Funktionen (3-1) angepasst ($n \geq 3$).

$$A(t) = A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad \text{mit} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad 3-1$$

Cholesterolanalog	1. Komponente			2. Komponente		
	Anteil (%)	k_1 (min ⁻¹)	$t_{1/2}$	Anteil (%)	k_2 (min ⁻¹)	$t_{1/2}$
SL-Chol	10 ± 1	0,8 ± 0,3	52 s	90 ± 1	0,0082 ± 0,0005	85 min
SL-C	62 ± 6	0,24 ± 0,03	173 s	38 ± 6	0,038 ± 0,008	18 min
SL-A	39 ± 2	1,3 ± 0,2	33 s	61 ± 2	0,080 ± 0,004	9 min

Die erste Komponente der Reduktionsverläufe wird mit Halbwertszeiten $t_{1/2}$ von 0,5 bis drei Minuten reduziert, die zweite dagegen mit neun bis 85 Minuten deutlich langsamer. Sowohl die Reduktionszeiten als auch die Spinsondenanteile, die in der jeweiligen Fraktion enthalten sind, variieren zwischen den drei Cholesterolanalog sehr stark (Tabelle 1).

3.1.2 Reduktion der verschiedenen Cholesterolanalog mit 6-O-Phenylaskorbat

Marx et al. verwiesen 1997 darauf, dass die Reduktion der Spinsonden mittels 6-O-Phenylaskorbat im Vergleich zu Ascorbat um mehr als eine Größenordnung beschleunigt werden kann. Dies sollte es möglich machen, die Reduktion der beiden Spinsondenfraktionen besser voneinander zu trennen, da nur die Reduktionsgeschwindigkeit der direkt zugänglichen

Spinsonden verändert wird. Um diesen Effekt auszunutzen, wurden die oben genannten Cholesterolanaloge in Diskmembranen mit 6-O-Phenylaskorbat reduziert.

Die Spinsonden-Membransuspensionen wurden wie unter 2.6.2.1 beschrieben hergestellt. Die Reduktion erfolgte mit 17 mM 6-O-Phenylaskorbat. In Abbildung 16 sind diese Reduktionsverläufe von SL-Chol, SL-C und SL-A in Diskmembranen bei 4 °C dargestellt. Die Zugänglichkeit der Spinsonden zu 6-O-Phenylaskorbat ist im Vergleich zu Askorbat stark erhöht. Im zeitlichen Verlauf des Experimentes werden etwa 85 % von SL-Chol reduziert, im Vergleich dazu sind es mit Askorbat 30 %. SL-C und SL-A sind bereits nach 15 Minuten vollständig reduziert.

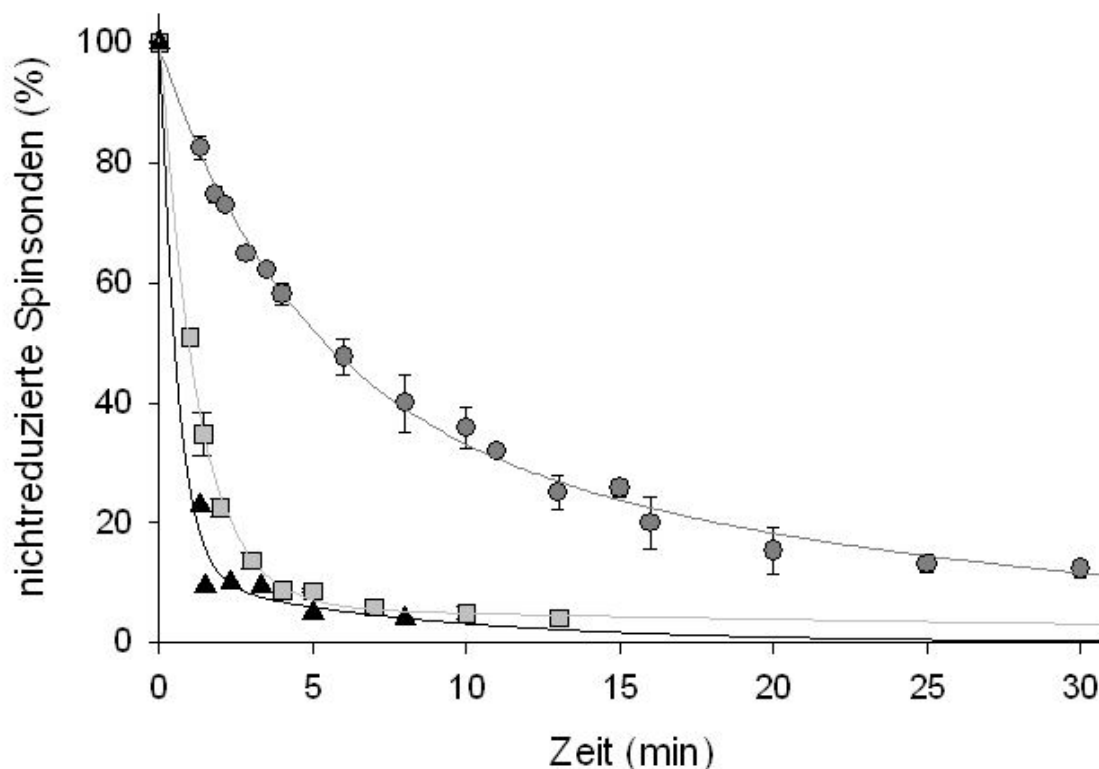


Abbildung 16: 6-O-Phenylaskorbatreduktion von spinmarkierten Cholesterolanaloge in Diskmembranen

SL-Cholesterol (●), SL-Cholestan (▲) bzw. SL-Androstan (■) wurden in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4, 20 °C) eingebaut (Abbildung 14 beschrieben). Die Spinsondenkonzentration betrug 0,3 mol% bezogen auf die Lipidkonzentration der Diskmembranen. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 6-O-Phenylaskorbat (17 mM) bei 4 °C. Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens zwei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion.

Die aus den Reduktionsverläufen über eine biexponentielle Anpassung berechneten Parameter (Linien in Abbildung 16) sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Im Vergleich zu Askorbat haben sich sowohl die Spinsondenanteile als auch deren Reduktionsgeschwindigkeiten verändert. Von SL-Chol sind etwa 50 % der Moleküle mit einer Halbwertszeit von drei Minuten reduzierbar und die anderen 50 % mit 17 Minuten. Mit Askorbat waren es 10 % in 52 Sekunden und 90 % in 85 Minuten. Der Wechsel des Reduktionsmittels von Askorbat zu 6-O-Phenylaskorbat hat nicht wie erwartet nur die Reduktionsgeschwindigkeiten der schnelleren Komponente erhöht, um eine bessere Trennung der Spinsondenfraktionen des jeweiligen Cholesterolanalog zu erreichen. Sondern es haben sich alle Parameter des Reduktionsverlaufes verändert. Das kann nur durch zusätzliche Effekte des 6-O-Phenylaskorbat erklärt werden.

Tabelle 2: Parameter der biexponentiellen Funktionen der 6-O-Penylaskorbatreduktion von Cholesterolanalog in Diskmembranen

Die Daten der in Abbildung 16 dargestellten Reduktionsverläufe der Cholesterolanalog in Diskmembranen wurden an biexponentielle Funktionen (3-1) angepasst ($n \geq 2$).

Cholesterolanalog	1. Komponente			2. Komponente		
	Anteil (%)	k_1 (min^{-1})	$t_{1/2}$	Anteil (%)	k_2 (min^{-1})	$t_{1/2}$
SL-Chol	58 ± 7	$0,22 \pm 0,03$	180 s	40 ± 7	$0,042 \pm 0,007$	17 min
SL-C	89 ± 14	$1,7 \pm 0,8$	24 s	11 ± 13	$0,1 \pm 0,3$	5 min
SL-A	94 ± 3	$0,81 \pm 0,05$	51 s	6 ± 3	$0,02 \pm 0,06$	31 min

3.1.3 Temperaturabhängige Askorbatreduktion von SL-Cholestan in Diskmembranen

Um weitere Informationen zur Verteilung von Cholesterol in Diskmembranen zu erlangen, wurden temperaturabhängige Messungen der Askorbatreduktion von SL-C durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen über einen Temperaturbereich von 4 °C bis 35 °C dargestellt.

Mit steigender Temperatur erhöht sich die Geschwindigkeit der Reduktion. Über den gesamten Temperaturbereich lassen sich die Daten der einzelnen Reduktionsverläufe mit biexponentiellen Funktionen beschreiben, woraus auf zwei Fraktionen von SL-C geschlossen werden

kann. Diese Fraktionen unterscheiden sich durch ihre Zugänglichkeit zum Ascorbat. Die Parameter dieser Funktionen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Sowohl die Halbwertszeiten der Reduzierbarkeit der ersten Komponente, als auch die der zweiten nehmen mit steigender Temperatur ab. Dagegen bleiben die Spinsondenanteile über den gesamten Temperaturbereich konstant, mit 60-70 % in der schnellen Komponente und ca. 30-40 % in der langsameren.

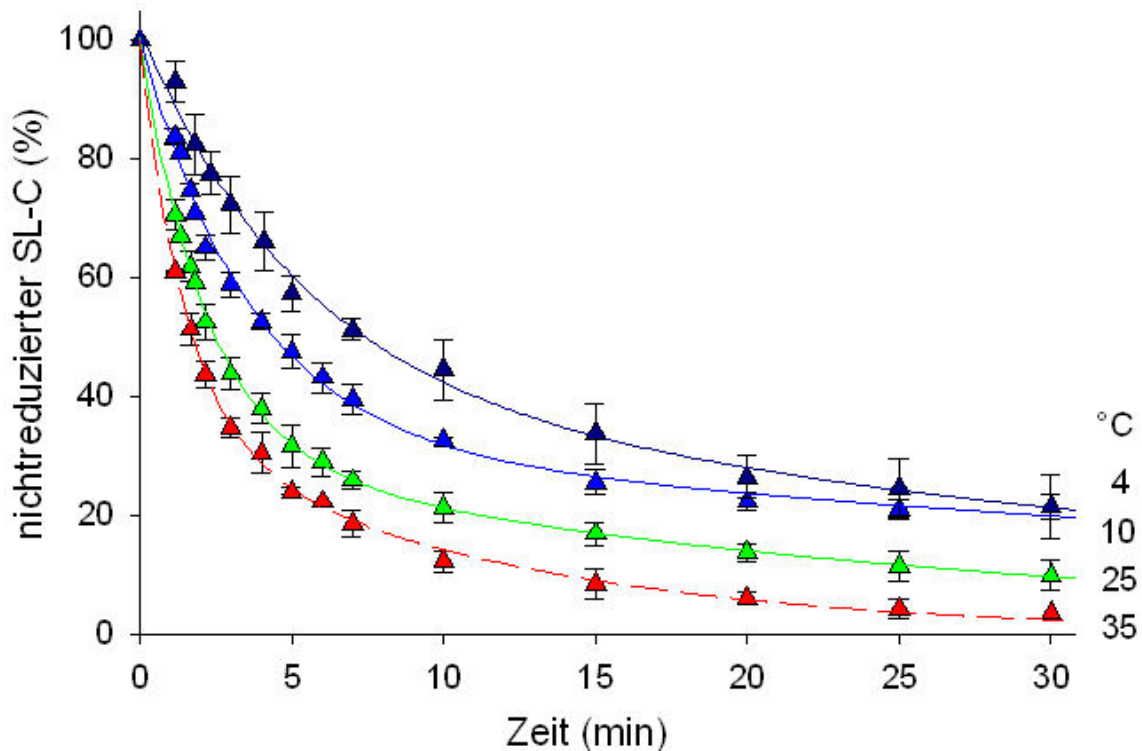


Abbildung 17: Temperaturabhängige Ascorbatreduktion von spinmarkiertem Cholestan in Diskmembranen

SL-Cholestan wurde in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4, 20 °C) eingebaut (wie bei Abbildung 14 beschrieben). Die Spinsondenkonzentration betrug 0,8 mol% bezogen auf die Lipidkonzentration der Diskmembranen. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von Ascorbat (50 mM) bei 4 °C (\blacktriangle), 10 °C (\triangle), 25 °C (\blacktriangle) bzw. 35 °C (\blacktriangle). Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion.

Tabelle 3: Parameter der biexponentiellen Funktionen der temperaturabhängigen Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen

Die Daten der in Abbildung 17 dargestellten Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen wurden an biexponentielle Funktionen (3-1) angepasst ($n \geq 3$).

Reduktions- temperatur	1. Komponente			2. Komponente		
	Anteil (%)	k_1 (min^{-1})	$t_{1/2}$	Anteil (%)	k_2 (min^{-1})	$t_{1/2}$
4°C	59 ± 11	0,20 ± 0,04	3,5 min	43 ± 12	0,02 ± 0,01	35 min
10°C	68 ± 4	0,28 ± 0,03	2,5 min	33 ± 5	0,017 ± 0,006	41 min
25°C	70 ± 1	0,45 ± 0,01	1,5 min	30 ± 1	0,038 ± 0,003	18 min
35°C	65 ± 3	0,66 ± 0,04	1 min	34 ± 3	0,090 ± 0,008	8 min

Eine quantitative Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Temperatur kann mit der Arrhenius-Gleichung hergestellt werden. Diese Gleichung lautet:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \quad 3-2$$

mit k = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, A = präexponentieller Faktor, E_A = Aktivierungsenergie, R = universelle Gaskonstante und T = absolute Temperatur in Kelvin.

Trägt man die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante logarithmisch gegen den Kehrwert der Temperatur auf (Arrheniusplot), so erhält man aus dem Anstieg der entstandenen Geraden die Aktivierungsenergie der Reaktion. In Abbildung 18 ist der Arrheniusplot der beiden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen dargestellt. Die daraus berechnete Aktivierungsenergie für die schnelle Komponente der Reduktionsverläufe beträgt 29 ± 2 kJ/mol und für die langsame 33 ± 5 kJ/mol. Wie bereits aus der grafischen Darstellung ersichtlich, sind die Aktivierungsenergien für beide Komponenten gleich groß.

Es existieren daher zwei Populationen von SL-C in Diskmembranen, die sich durch ihre Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel unterscheiden, aber gleiche Aktivierungsenergien beider Reduktionsprozesse aufweisen.

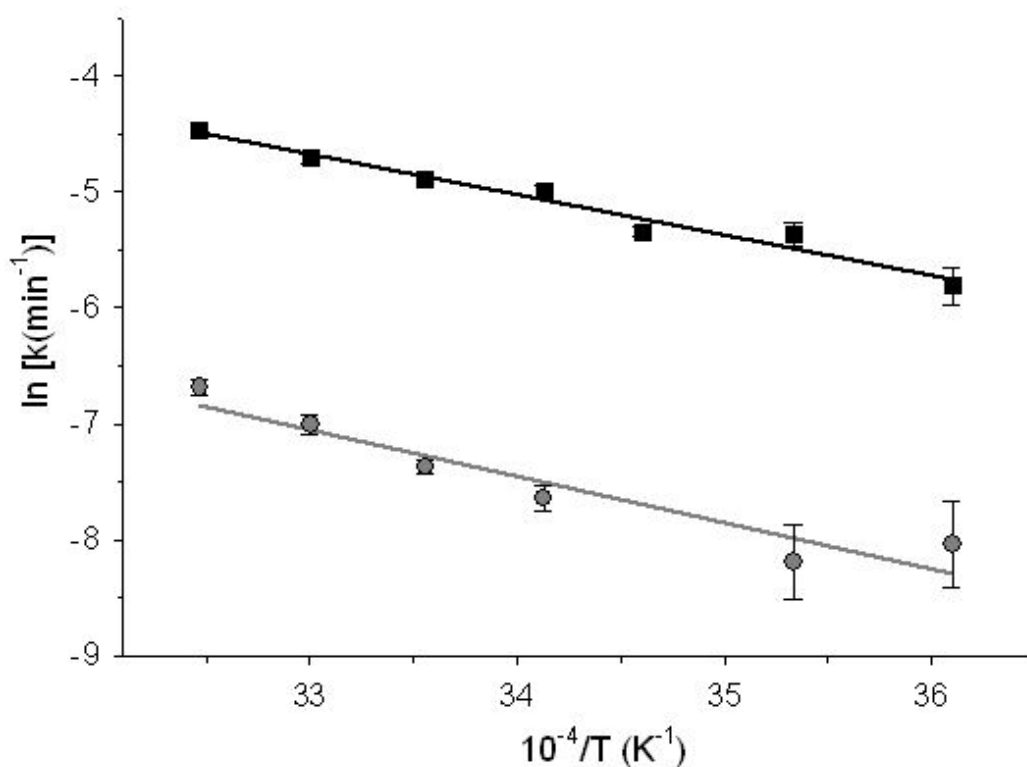


Abbildung 18: Arrheniusplot der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen

Die aus den Reduktionsverläufen der Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen (Abbildung 17) berechneten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sind logarithmisch gegen den Kehrwert der Temperatur aufgetragen (1. Komponente (■), 2. Komponente (●)). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt.

3.1.4 Ascorbatreduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Spinsonde

Die Abhängigkeit des Reduktionsverlaufes von der Inkubationszeit von SL-C mit Diskmembranen wurde untersucht. Somit wird eine bessere Interpretation der beiden Reduktionskomponenten möglich.

In Abbildung 19 sind die Reduktionsverläufe mit vier Minuten und drei Stunden Inkubationszeit dargestellt. Es zeigten sich keine Unterschiede im zeitlichen Reduktionsverhalten bei 20 °C. Die Zugänglichkeit des Reduktionsmittels zu beiden Spinsondenpopulationen ist daher unabhängig von der Zeit, die den Spinsondenmolekülen zur Verfügung steht, sich in der Membran zu verteilen.

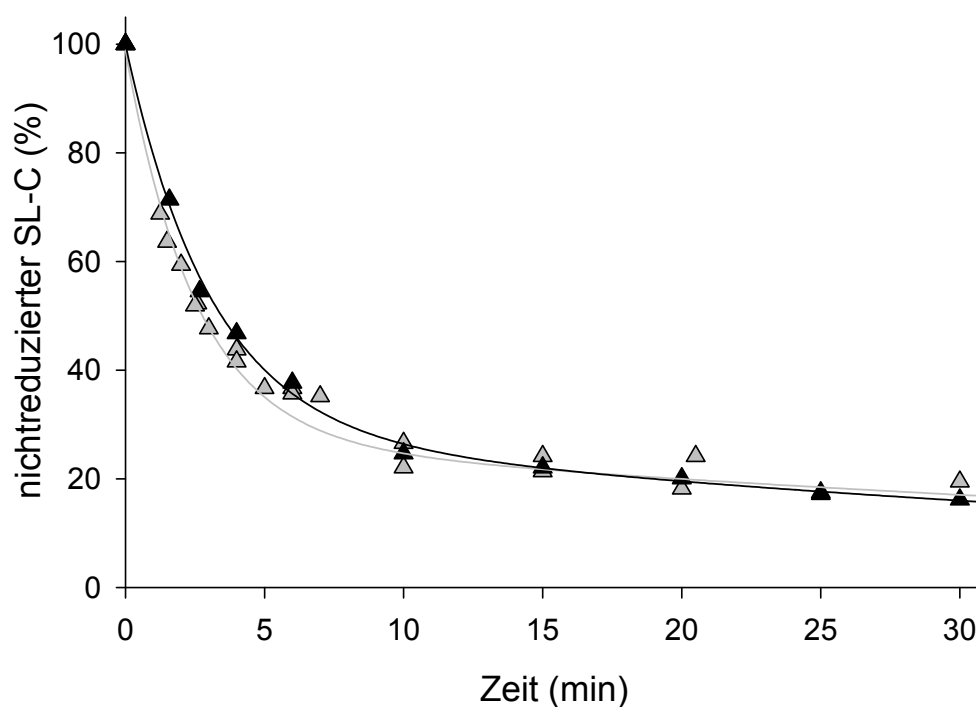


Abbildung 19: Einfluss der Inkubationszeit auf die Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen

SL-C wurde bei 20 °C in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4) eingebaut (wie bei Abbildung 14 beschrieben). Die Spinsondenkonzentration betrug 0,8 mol% bezogen auf die Lipidkonzentration der Diskmembranen. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von Ascorbat (50 mM) bei 20 °C unmittelbar nach Spinsondenzugabe (▲) bzw. nach drei Stunden (▲). Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion.

3.1.5 Vergleich der Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen und symmetrisch markierten POPC-Vesikeln

Ein Vergleich der Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen mit denen in symmetrisch markierten POPC-Vesikeln wurde durchgeführt, um genaue Aussagen zur Verteilung des Cholesterols in Diskmembranen treffen zu können. Die Zugabe der Spinsonde erfolgte vor der POPC-Vesikelpräparation, so dass von einer symmetrischen Verteilung von SL-C in der POPC-Membran ausgegangen wird.

Zusätzlich wurde die Ascorbatreduktion von SL-C in POPC-Vesikeln bei 20 °C mit der von spinmarkiertem Phosphatidylcholin (SL-PC) in POPC-Vesikeln verglichen, da im letzteren Fall die Verteilung der Spinsonde in der POPC-Membran bekannt ist. Der Reduktionsverlauf von SL-PC in POPC-Vesikeln ist in Abbildung 20 A dargestellt. Er zeigt mit einem Plateau

bei 50 % die erwartete symmetrische Verteilung, da nur der Spinsondenanteil in der äußeren Membranlipidschicht der Reduktion durch Ascorbat zur Verfügung steht. Dieser Reduktionsverlauf kann mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden.

In Abbildung 20 B ist die Ascorbatreduktion von SL-C in POPC-Vesikeln bei 20 °C dargestellt. Auch dieser Reduktionsverlauf kann mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Das Plateau erreicht einen Wert von ca. 25 %, d.h. ca. 75 % der Spinsonden können durch Ascorbat reduziert werden, zeigt aber nicht die erwartete symmetrische Verteilung. Aufgrund dieser Diskrepanz erfolgte die Reduktion von SL-C in POPC-Vesikeln bei weiteren Temperaturen, um zusätzliche Informationen zu erhalten.

Ein direkter Vergleich der Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln bei verschiedenen Temperaturen ist in Abbildung 21 dargestellt. Die, aus der Anpassung einer biexponentiellen Funktion errechneten, Parameter dieser Reduktionsverläufe sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Auch die monoexponentiellen Reduktionsverläufe wurden an eine biexponentielle Funktion angepasst, und es zeigt sich wie erwartet eine unendlich große Halbwertszeit der zweiten Komponente.

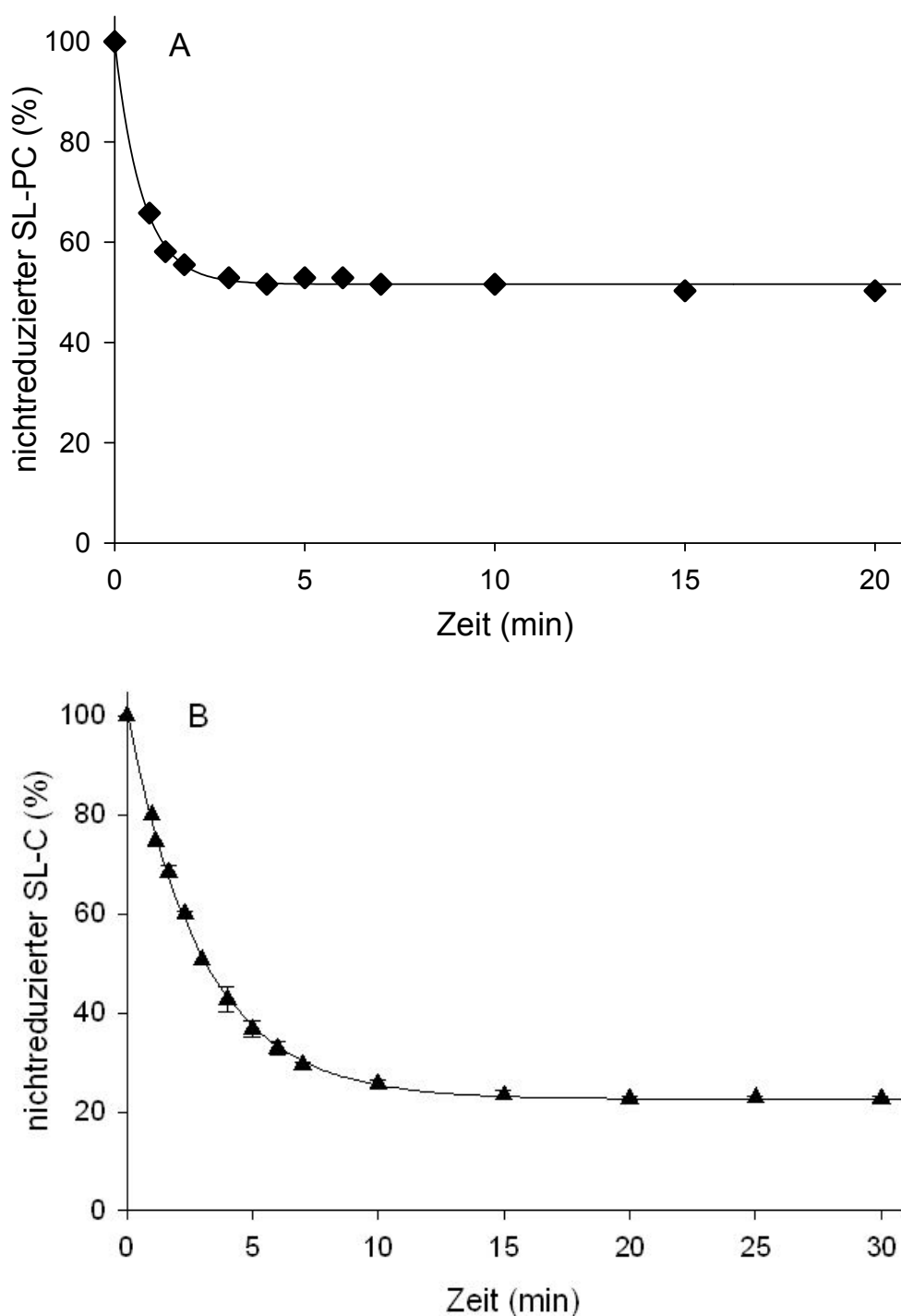


Abbildung 20: Vergleich der Ascorbatreduktion von SL-C und spinmarkiertem Phosphatidylcholin (SL-PC) in POPC-Vesikeln

Die Ascorbatreduktion (50 mM) von A SL-PC (◆, 1 mol%) und B SL-C (▲, 1 mol%) erfolgte in symmetrisch markierten, unilamellaren POPC-Vesikeln (4 mM Lipid in Puffer 2, pH 7,4) bei 20 °C. Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten von SL-PC (◆) zeigen ein einzelnes Experiment, von SL-C (▲) sind sie als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer monoexponentiellen Funktion.

Tabelle 4: Parameter der biexponentiellen Funktionen der Ascorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln

Die Daten der in Abbildung 21 dargestellten Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln wurden an biexponentielle Funktionen (3-1) angepasst ($n \geq 3$). (Komp. = Komponente)

Reduk- tions- temperatur	Reduktions- kompo- nenten	Diskmembranen			POPC-Vesikel		
		Anteil (%)	k (min ⁻¹)	t _{1/2}	Anteil (%)	k (min ⁻¹)	t _{1/2}
4 °C	1. Komp.	60 ± 9	0,18 ± 0,03	4 min	35 ± 6	0,36 ± 0,11	2 min
	2. Komp.	41 ± 9	0,019 ± 0,009	36 min	64 ± 6	0,03 ± 0,006	23 min
20 °C	1. Komp.	68 ± 2	0,41 ± 0,02	2 min	78 ± 1	0,33 ± 0,01	2 min
	2. Komp.	33 ± 2	0,029 ± 0,003	24 min	23 ± 1	-	> 1 d
30 °C	1. Komp.	71 ± 2	0,54 ± 0,03	1 min	79 ± 3	0,48 ± 0,04	1,5 min
	2. Komp.	30 ± 2	0,054 ± 0,005	13 min	22 ± 3	0,004 ± 0,006	3 h

Bei 4 °C zeigen sich sehr ähnliche Reduktionsverläufe. Die Parameter der biexponentiellen Funktion unterscheiden sich jedoch voneinander, sowohl in der Verteilung der Spinsonden auf die beiden Komponenten als auch in den Reduktionsgeschwindigkeitskonstanten.

Bei 20 °C verläuft der erste Teil der Reduktion nahezu identisch, d.h. 70-80 % der Spinsonden können mit einer Halbwertszeit von zwei Minuten reduziert werden. Gleiches gilt für die Reduktion bei 30 °C, wobei die Halbwertszeit etwa eine Minute beträgt. Die zweite Komponente ist in POPC-Vesikeln deutlich langsamer als in Diskmembranen. Wie bereits oben erwähnt, lässt sich die Reduktion von SL-C in POPC-Vesikeln bei 20 °C durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben, d.h. alle, dem Reduktionsmittel zugänglichen, Spinsonden werden mit der gleichen Halbwertszeit reduziert, und es gibt einen Spinsondenanteil, welcher dem Reduktionsmittel nicht zugänglich ist. Bei 30 °C ist dieser Anteil mit einer Halbwertszeit von etwa drei Stunden reduzierbar.

Die Ascorbatreduktion von SL-C in POPC-Vesikeln zeigt bei keiner der untersuchten Temperaturen eine symmetrische Verteilung wie bei SL-PC in den POPC-Membranen beobachtet.

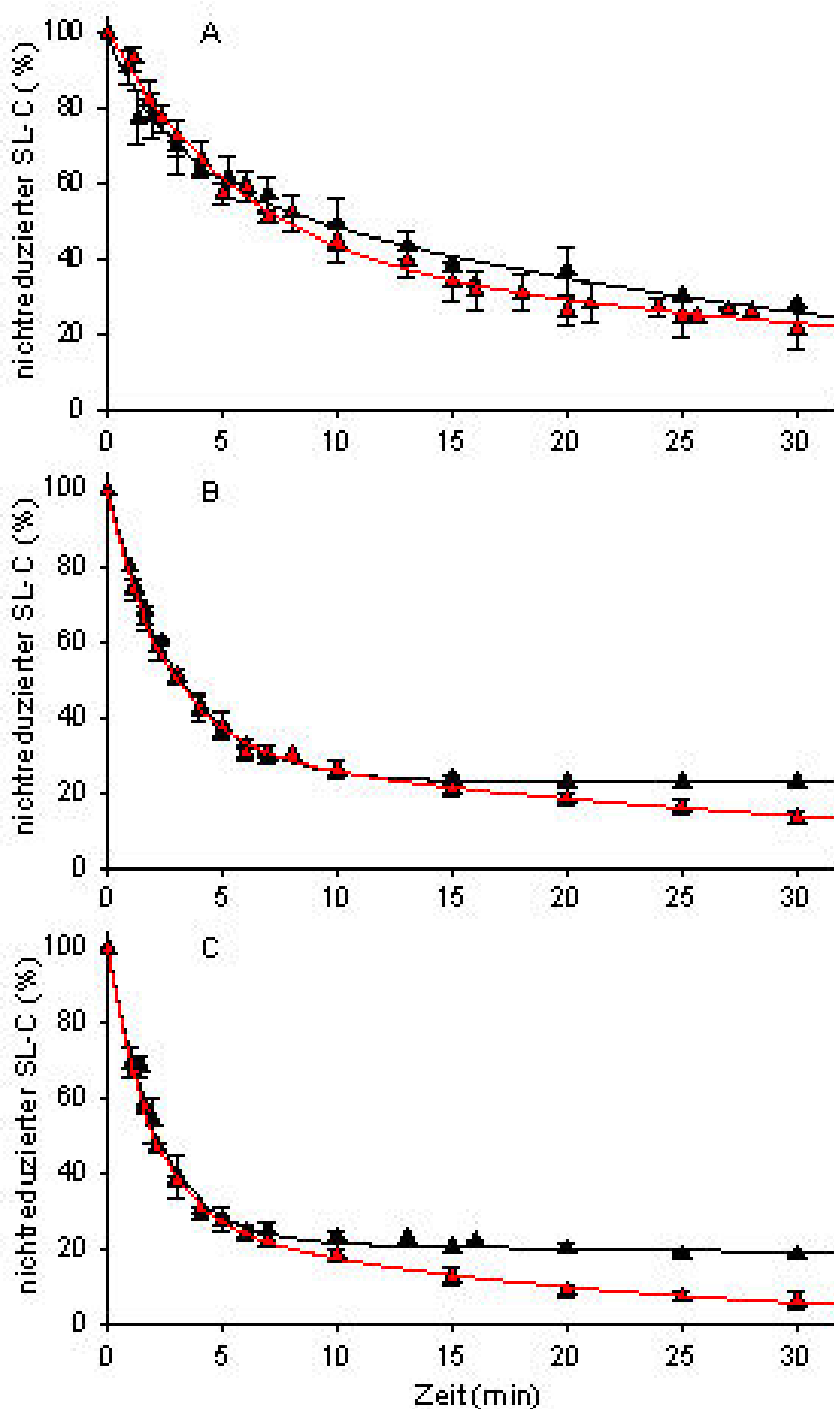


Abbildung 21: Vergleich der Reduktionsverläufe von SL-C in Diskmembranen und POPC Vesikeln bei unterschiedlichen Temperaturen

SL-C (▲) in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4, 20 °C, 0,8 mol%) bzw. symmetrisch markierten unilamellaren POPC-Vesikeln (▲, 4 mM POPC, pH 7,4, 1 mol%) wurde bei 4 °C (A), 20 °C (B) bzw. 30 °C (C) mit Askorbat (50 mM) reduziert. Die Abnahme des Niedrigfeldpeaks des ESR-Spektrums ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. Die Linien zeigen die errechneten Kurven nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion.

3.1.6 Vergleich der ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln

Der Vergleich der ESR-Spektren von SL-C in den beiden genannten Vesikeln soll Aufschlüsse über eventuelle Unterschiede in der Mobilität der Spinsonde geben, bedingt durch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung. Aus diesem Grund wurde SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikel eingebaut und dessen ESR-Spektren über einen Temperaturbereich von 4-35 °C aufgenommen. Aus diesen ESR-Spektren wurden der Ordnungsparameter S und die Rotationskorrelationszeit τ_R ermittelt. Beide Parameter geben Auskunft über das Maß und die Geschwindigkeit der Spinsondenmobilität.

In Abbildung 22 sind die ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln für verschiedene Temperaturen gegenübergestellt. Eine Verminderung der Mobilität von SL-C mit abnehmender Temperatur (von rot nach blau) ist durch die Linienverbreiterung zu erkennen. D.h. die Höhe der Peaks (Niedrig-, Mittel- und Hochfeldpeak) nimmt ab und die Breite nimmt zu.

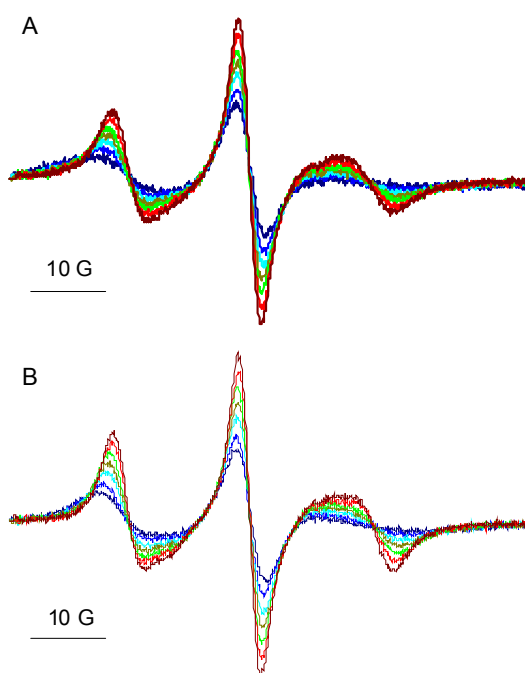


Abbildung 22: Temperaturabhängige ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln

SL-C wurde in Diskmembranen (43 μ M Rhodopsin, pH 7,4, 0,8 mol%) eingebaut (A) (wie bei Abbildung 14 beschrieben) bzw. symmetrisch markierte POPC-Vesikel mit SL-C präpariert (B) (4 mM POPC, pH 7,4, 1 mol%). Die Aufnahme der ESR-Spektren (2 G Modulation, viermal akkumuliert) erfolgte bei 4 °C (dunkelblau), 10 °C (blau), 16 °C (cyan), 20 °C (dunkelgelb), 25 °C (grün), 30 °C (rot) und 35 °C (dunkelrot).

Ein Vergleich der, aus diesen ESR-Spektren ermittelten, Parametern (S und τ_R) von Diskmembranen und POPC-Vesikeln ist in Abbildung 23 dargestellt. Bei niedrigeren Temperaturen liegt der Ordnungsparameter (Abbildung 23 A) in POPC-Vesikeln deutlich über dem in Diskmembranen, was auf eine geringere molekulare Beweglichkeit hindeutet. Insgesamt ist der Verlauf in POPC steiler. Somit zeigt SL-C in POPC eine stärkere Temperaturabhängigkeit als in Diskmembranen. Die Rotationskorrelationszeiten weisen für beide Membranen den gleichen Temperaturverlauf auf, wobei diese in Diskmembranen um etwa 0,5 ns langsamer sind. Folglich beschreiben die Bewegungsparameter von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln eine hohe Mobilität, jedoch besteht in POPC eine größere Temperaturabhängigkeit.

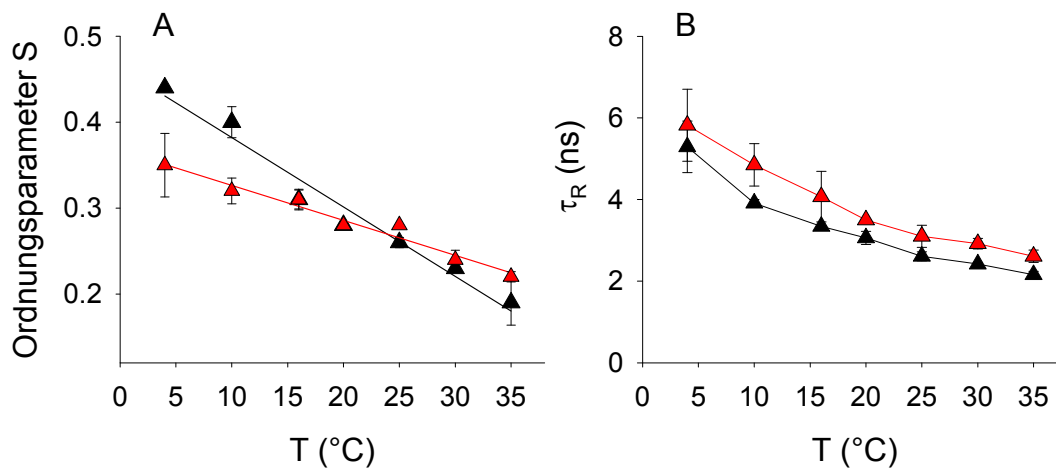


Abbildung 23: ESR-Parameter von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln

Aus den ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen (▲) und POPC-Vesikeln (▲) (Abbildung 22) wurden der Ordnungsparameter S (A) und die Rotationskorrelationszeit τ_R (B) bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen.

3.2 Dichtezentrifugation nativer Diskmembranen

Entlang des Stäbchenaußensegmentes existiert der bereits erwähnte Cholesterolgradient. Diskmembranen besitzen am basalen Ende einen höheren Cholesterolgehalt als am apikalen Ende. Die Diskvesikelpräparation nach Smith et al. (1975) erzeugt eine Mischpopulation an Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Diskmembranen in Abhängigkeit von ihrem Cholesterolgehalt zu präparieren. Dafür wurde

eine Digitonininkubation mit anschließender Dichtezentrifugation nach Vorlage von Boesze-Battaglia et al. (1989) durchgeführt.

Es wurden Diskmembranen mit Digitonin inkubiert und auf kontinuierliche Saccharosegradienten aufgeschichtet. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse unter den experimentellen Bedingungen dargestellt, welche die weiteste Auftrennung der Bande ergaben (30 μ M Rhodopsin, Digitonin-Cholesterol-Verhältnis 1 mol:1 mol, in Puffer 2, pH 7,4, Saccharosegradient von 22-32 %). Die Bestimmung des Cholesterolgehaltes der entnommenen Fraktionen ergab keine Unterschiede. Die Diskmembranen wiesen in allen Fraktionen den gleichen Cholesterolgehalt von ca. 9 mol% auf. Es konnte unter keinen Bedingungen eine Auftrennung der Diskmembranen in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt erzielt werden.

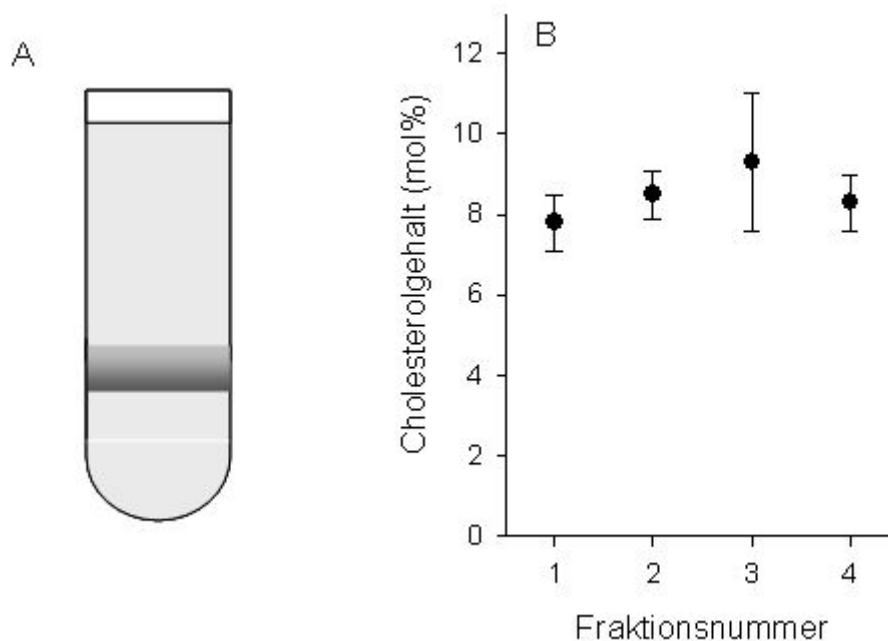


Abbildung 24: Dichtezentrifugation von Diskmembranen nach Digitoninbeladung

A Nach der Dichtezentrifugation (52000 g, 4 °C, 4 h) der digitoninbeladenen Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin, Digitonin-Cholesterol-Verhältnis 1 mol:1 mol, in Puffer 2, pH 7,4) in einem Saccharosegradienten (22-32 %) wurde die Bande in Fraktionen entnommen. (schematische Darstellung eines Zentrifugationsröhrchens mit Membranbande (dunkelgrau)) **B** Cholesterolgehalt der einzelnen Fraktionen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt.

3.3 Modifikation des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen

Eine Präparation der Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt entsprechend dem Cholesterolgradienten entlang des Stäbchenaußensegtes war nicht möglich. Deshalb

wurde der Cholesterolgehalt von Diskmembranen nach deren Präparation verringert bzw. erhöht, um den Einfluss des Cholesterols auf die Proteine der visuellen Signaltransduktion untersuchen zu können. Die nach der Methode von Smith präparierten Diskmembranen besitzen einem mittleren Cholesterolgehalt von $9,9 \pm 0,5$ mol%.

Der Entzug von Cholesterol erfolgte durch Inkubation der Diskmembranen mit verschiedenen Konzentrationen von zufällig methyliertem β -Cyclodextrin (randM β CD). Eine Erhöhung des Cholesterolgehaltes resultierte aus der Inkubation von Diskmembranen mit Cholesterol-M β CD-Komplexen, wodurch das, in den Komplexen enthaltene, Cholesterol in die Diskmembranen eingebaut wurde.

In Abbildung 25 A ist der Cholesterolgehalt der Diskmembranen dargestellt, der sich aus dem Entzug bzw. der Beladung mit verschiedenen Konzentrationen an randM β CD bzw. Cholesterol-M β CD-Komplexen ergab. Durch Inkubation der Diskmembranen mit 3 mM randM β CD wurden ca. 30 % des Cholesterols entzogen, so dass der Cholesterolgehalt auf $6,7 \pm 0,7$ mol% verringert werden konnte. Die Inkubation mit Cholesterol-M β CD-Komplexen führte zu einer Erhöhung des Cholesterolgehaltes bis zu $32,1 \pm 0,2$ mol%, was bereits über dem Wert der basalen Diskmembranen liegt.

Zusätzlich zum Cholesterolgehalt wurde auch der Gehalt an Phospholipiden in den modifizierten Diskmembranen bestimmt. Dafür wurde zuerst eine Lipidextraktion durchgeführt, der eine Phosphatbestimmung folgte. Abbildung 25 B zeigt den Phosphatgehalt der modifizierten Diskmembranen (normiert auf den Phosphatgehalt der unbehandelten Diskmembranen). Die Inkubation mit randM β CD bzw. Cholesterol-M β CD-Komplexen zeigte keine signifikante Veränderung des Phospholipidgehaltes der Diskmembranen.

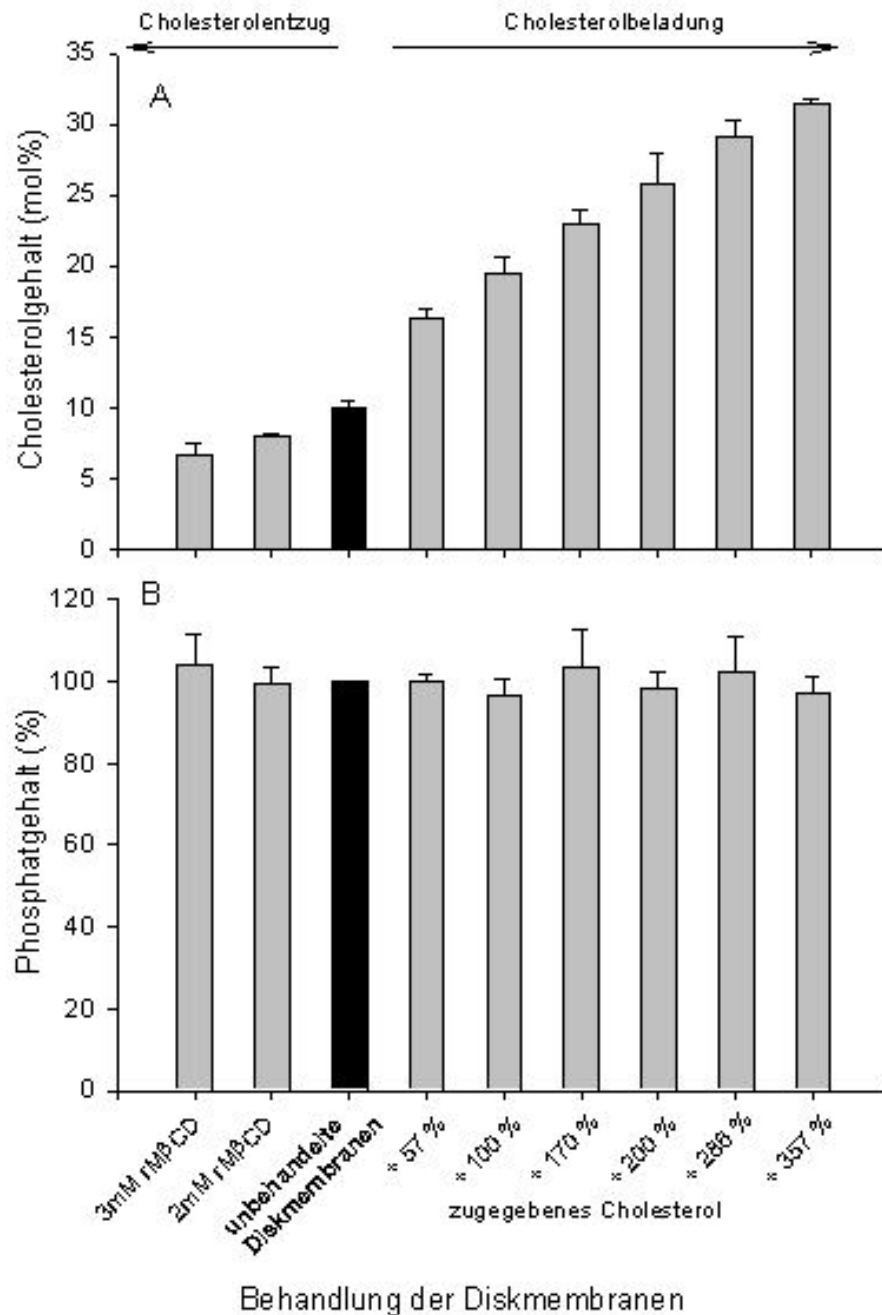


Abbildung 25: Modifikation des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen

Der Cholesterolgehalt von Diskmembranen wurde durch Inkubation mit randMβCD verringert bzw. durch Inkubation mit Cholesterol-MβCD-Komplexen erhöht. In **A** ist der resultierende Cholesterolgehalt und in **B** die Ergebnisse der Phosphatbestimmung der in A gezeigten Proben, normiert auf den Phosphatgehalt der unbehandelten Diskmembranen, dargestellt. Die Abszissen zeigen die eingesetzten Konzentrationen an randMβCD (Entzug) bzw. Cholesterol (Beladung, zugegebenes Cholesterol in Cholesterol-MβCD-Komplexen, bezogen auf die interne Cholesterolmenge der unbehandelten Diskmembranen). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt.

Somit ist es mit den beiden genannten Methoden möglich, den Cholesterolgehalt von Diskmembranen von 7-32 mol% zu variieren ohne die Phospholipide zu beeinflussen, was eine Untersuchung des Effektes von Cholesterol auf die visuelle Signaltransduktion möglich macht. Eine Einschätzung, ob bzw. wie sich das zusätzliche Cholesterol in die Diskmembranen eingebaut hat, folgte durch weitere Untersuchungen dieser modifizierten Diskmembranen.

3.4 Kalorimetrische Untersuchung von Diskmembranen nach Cholesterolentzug bzw. –beladung

Zur Charakterisierung der Diskmembranen in Abhängigkeit vom veränderten Cholesterolgehalt, wurden kalorimetrische Untersuchungen (ITC) der modifizierten Membranen durchgeführt.

Die Zugabe von Diskmembranen zu einer randM β CD-Lösung in einem Kalorimeter führt zu einer endothermen Reaktion. Bei der Extraktion einiger Cholesterolmoleküle aus der Diskmembran in Cholesterol-randM β CD-Komplexe wird Wärme aufgenommen. Diese Wärmeänderung wurde zeitabhängig beobachtet.

In Abbildung 26 A ist ein typisches Extraktionsexperiment bei 25 °C dargestellt. Nach jeder Injektion der Diskmembranen (100 μ M Rhodopsin in Puffer 3) in die randM β CD-Lösung (5 mM) wird eine endotherme Wärmeänderung (Signal) beobachtet. Diese kehrt nach zehn bis 30 Minuten zur Grundlinie zurück, was das Erreichen eines neuen Gleichgewichtes bedeutet. Die Zeit, die zum Erreichen der Grundlinie benötigt wird, und die Signalamplitude hängen vom Cholesterolgehalt der zugegebenen Membranen ab. Die unterschiedlichen Signalamplituden der ersten fünf Injektionen sind durch das verringerte Injektionsvolumen bedingt, welches so gewählt wurde, um eine bessere Auflösung der Titrationskurve zu erhalten.

In Abbildung 26 B sind die integrierten Wärmewerte der Cholesterolextraktion aus Abbildung 26 A dargestellt. Sie wurden auf die molare Menge an zugegebenen Phospholipiden normiert. Diese Kurve (Abbildung 26 B) wurden einem Modell zur Extraktion von Cholesterol aus Membranen durch M β CD von Tsamaloukas et al. (2005) angepasst (schwarze Linie) und damit die Parameter des Extraktionsexperimentes ermittelt. Diese Parameter beinhalten den Verteilungskoeffizienten K_X , der die Verteilung des Cholesterols zwischen randM β CD und den Diskmembranen beschreibt, und die Transferenthalpie ΔH , die die Wärmeänderung aufgrund des Transfers von Cholesterol von Diskmembranen zu randM β CD darstellt.

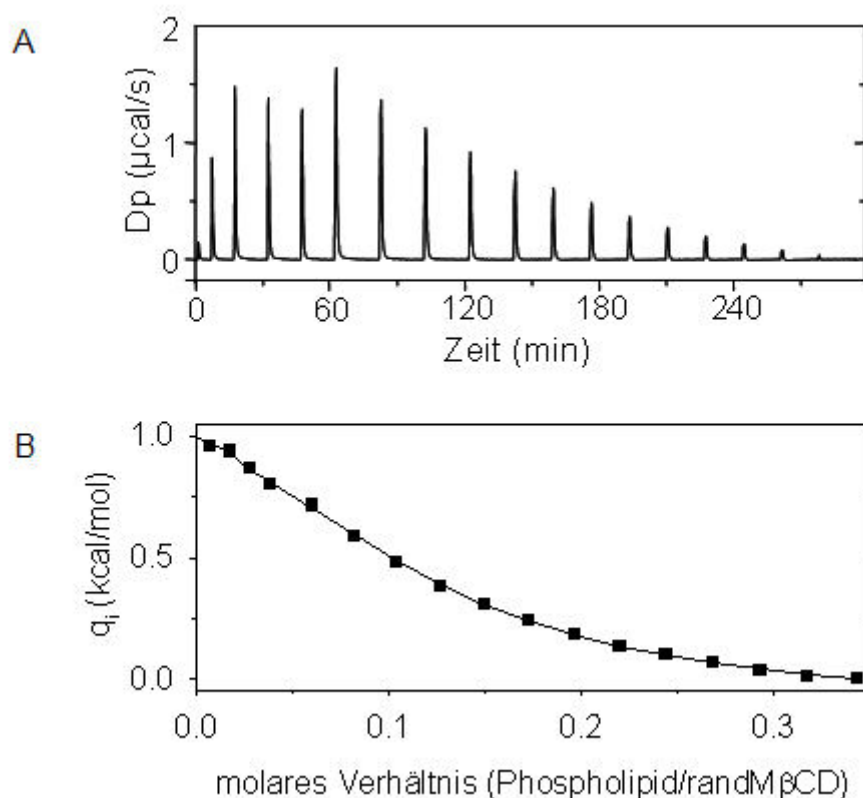


Abbildung 26: Kalorimetrische Untersuchung der Diskmembranen

A Die Wärmeänderungen (D_p) nach jeder Injektion von Diskmembranen (100 μM Rhodopsin, 26 mol% Cholesterol) in eine 5 mM randM β CD-Lösung bei 25 °C sind gegen die Zeit aufgetragen. Das Injektionsprotokoll war: 1 x 1 μl , 1 x 5 μl , 3 x 10 μl und 13 x 20 μl der Diskmembranen. **B** Die integrierten Wärmewerte q_i , des unter A gezeigten Experimentes, bezogen auf die zugegebene Phospholipidmenge sind als Funktion des molaren Verhältnisses von Phospholipiden zu randM β CD dargestellt. Die Linie zeigt die Anpassung der Daten an das Modell (Tsamaloukas et al., 2005).

Vergleicht man diese Parameter in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen, können Aussagen über das Mischungsverhalten von Cholesterol mit den Phospholipiden der Membran gemacht werden. Abbildung 27 zeigt den Verteilungskoeffizienten und die Transferenthalpie in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen. In einem Cholesterolbereich von 7-26 mol% bleiben die Parameter unverändert. Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 29 mol% weisen dagegen signifikante Unterschiede in beiden Parametern auf. Sowohl der Verteilungskoeffizient als auch die Transferenthalpie sind erhöht. Dies weist auf ein verändertes Mischungsverhalten von Cholesterol mit den Phospholipiden der Diskmembranen hin. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden für alle weiteren Untersuchungen Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 7-26 mol% verwendet.

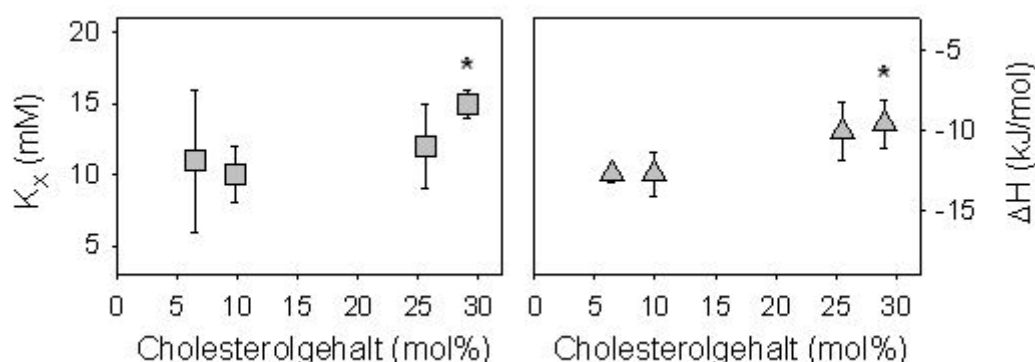


Abbildung 27: Thermodynamische Parameter der ITC Messungen

Mit dem in Tsamaloukas et al. (2005) beschriebenen Modell der Extraktion von Cholesterol aus Membranen in Cholesterol-randM β CD-Komplexe wurden der Verteilungskoeffizient K_X (■) und die Transferenthalpie ΔH (▲) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen ermittelt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt. * signifikant mit $p \leq 0,033$

3.5 Extrahierbarkeit spinmarkierter Phospholipide durch BSA aus Diskmembranen mit verändertem Cholesterolgehalt

Die transversale Verteilung der Phospholipide zwischen den beiden Lipidschichten einer Membran, kann mit spinmarkierten Phospholipiden und deren zeitabhängige Extrahierbarkeit durch Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) untersucht werden (Calvez et al., 1988; Hessel et al., 2000). Die spinmarkierten Lipide spiegeln eine kopfgruppenspezifische Verteilung der nativen Lipide in der Membran wider. Da nur der Spinsondenanteil in der äußeren Lipidschicht der Diskmembranen der Extraktion durch BSA zugänglich ist, können durch Trennung der Membranen von der BSA-Lösung (mittels Zentrifugation) die nichtextrahierten Spinsondenanteile im Pellet durch die ESR Messung quantitativ bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BSA-Extraktionsmethode auf die unter 3.3 beschriebenen Diskmembranen mit verändertem Cholesterolgehalt angewandt, um den Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Extrahierbarkeit der SL-PL zu untersuchen. Die spinmarkierten Phospholipide wurden in Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 7-26 mol% eingebaut. Dafür wurden SL-PL mit den Kopfgruppen Cholin (SL-PC), Ethanolamin (SL-PE) und Serin (SL-PS) mit Diskmembranen bei 20 °C gemischt. Der Einbau in die äußere Lipidschicht ist innerhalb von 30 Sekunden abgeschlossen (Hessel et al., 2000). Die Extrahierbar-

keit durch BSA und damit die Verteilung zwischen den Lipidschichten wurde zeitabhängig verfolgt, indem in fünf- bis 20-minütigen Abständen Aliquots entnommen, mit BSA für eine Minute auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation die extrahierten SL-PL von den Membranen getrennt wurden.

In Abbildung 28 ist der zeitliche Verlauf des nichtextrahierbaren Spinsondenanteils von SL-PE, SL-PS und SL-PC in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt dargestellt. Der Anteil nichtextrahierbarer Spinsonden nimmt innerhalb der ersten zehn Minuten sehr schnell zu und erreicht nach etwa einer Stunde ein Plateau. Tabelle 5 fasst die Werte des nichtextrahierbaren Spinsondenanteils nach Erreichen des Plateaus in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt für die drei verwendeten Phospholipidspinsonden zusammen. In unbehandelten Diskmembranen sind SL-PE und SL-PC nahezu symmetrisch zwischen den Lipidschichten verteilt. SL-PS zeigt dagegen eine asymmetrische Verteilung mit etwa 80 % der Spinsonden in der äußeren Lipidschicht.

Auf die Extrahierbarkeit von SL-PS hat der Cholesterolgehalt der Diskmembranen keinen Einfluss. In allen drei untersuchten Diskmembranpopulationen ist der Anteil der nichtextrahierbaren Spinsonden mit 17-18 % gleich groß. Die zeitlichen Verläufe sind identisch.

Es wurden keine Unterschiede in der Extrahierbarkeit von SL-PE in einem Cholesterolbereich von 7-16 mol% beobachtet. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol ist das Plateau jedoch um 3,6 % vermindert, d.h. es können im Vergleich zu den unbehandelten Diskmembranen mehr Spinsonden extrahiert werden. Diese Differenz tritt aber erst nach ca. 30 Minuten in Erscheinung.

Weiterhin sind in Abbildung 28 C die Extraktionsverläufe von SL-PC in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt dargestellt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede sowohl in Diskmembranen mit vermindertem als auch mit erhöhtem Cholesterolgehalt. Die Extrahierbarkeit durch BSA nimmt in beiden Fällen zu. Dieser Unterschied zeigt sich erst nach mehr als fünf Minuten. Zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme ($t = 5 \text{ min}$) ist er noch nicht signifikant.

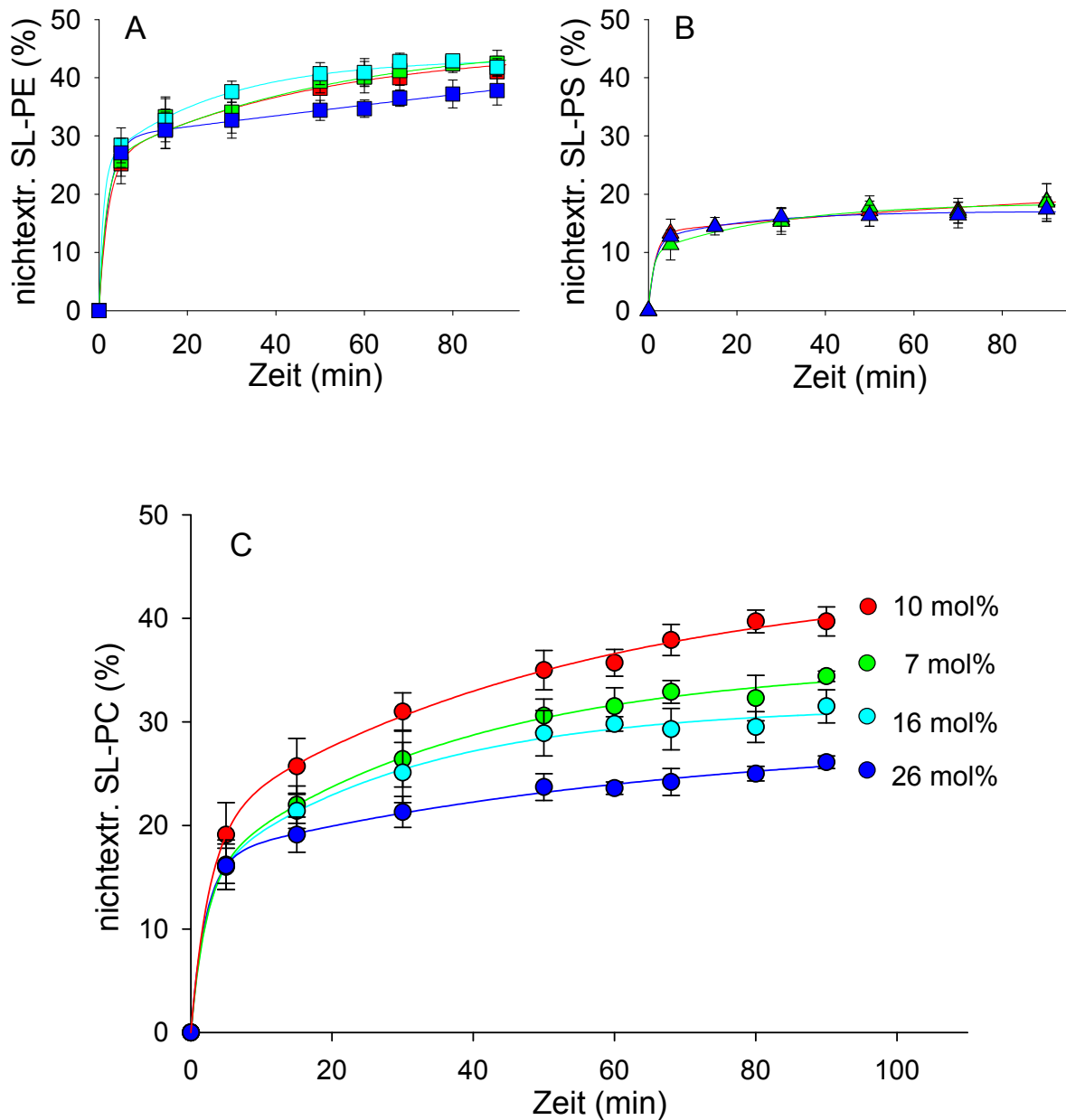


Abbildung 28: BSA-Extraktion von SL-PL aus Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

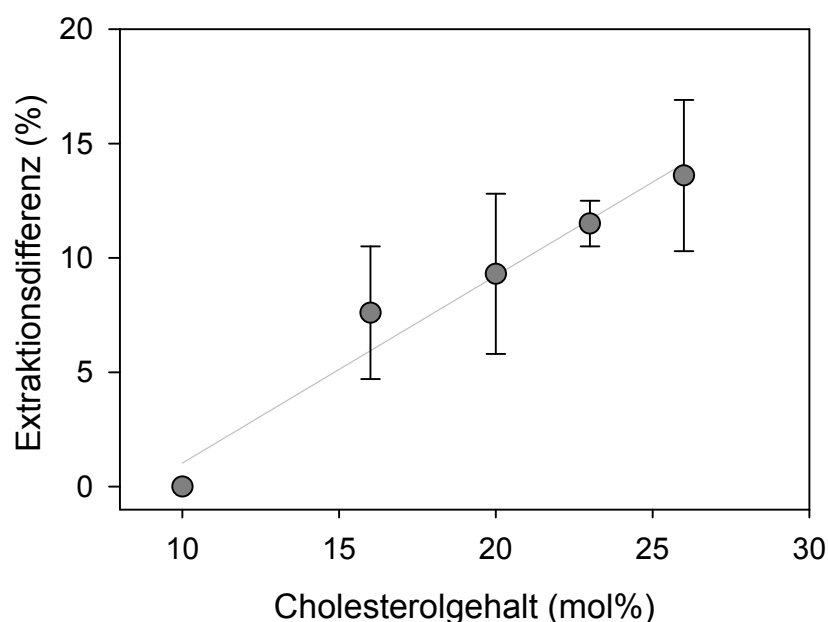
Die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipiden [A (SL-PE ■), B (SL-PS ▲) und C (SL-PC ●)] wurde an Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin, pH 7,4) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt bei 20 °C untersucht (rot: 10 mol%, grün: 7 mol%, cyan: 16 mol%, blau: 26 mol%). Die Spinsondenkonzentration betrug 1,4 mol% bezogen auf die interne Phospholipidmenge. Dargestellt ist die zeitabhängige Veränderung des nichtextrahierbaren Spinsondenanteils. Zum Zeitpunkt Null erfolgte die Zugabe der Spinsonden zur Diskmembransuspension. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen) dargestellt.

Tabelle 5: Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Anteile der nichtextrahierbaren SL-PL

Die nichtextrahierbaren Spinsondenanteile sind in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen zusammengestellt. * signifikant mit $p \leq 0,001$

Cholesterolgehalt (mol%)	nichtextrahierbare SL-PL (%)		
	SL-PE	SL-PS	SL-PC
$6,7 \pm 0,7$	42 ± 2	18 ± 3	$33 \pm 2^*$
$9,9 \pm 0,5$	41 ± 3	18 ± 3	39 ± 2
26 ± 2	43 ± 2	-	$30 \pm 2^*$
$16,3 \pm 0,7$	$37 \pm 2^*$	17 ± 2	$25 \pm 1^*$

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der erhöhten Extrahierbarkeit von SL-PC und der steigenden Cholesterolkonzentration in Diskmembranen (Abbildung 29). Die Berechnung des Verhältnisses von Spinsondenmolekülen, deren Extrahierbarkeit verändert wurde, zu zusätzlich eingebautem Cholesterol zeigt, dass etwa 100 zusätzliche Cholesterolmoleküle ein Spinsondenmolekül in seiner Extrahierbarkeit beeinflussen.

**Abbildung 29: Zusammenhang zwischen Extrahierbarkeit und Cholesterolgehalt**

Die prozentualen Unterschiede in der Extrahierbarkeit von SL-PC im Vergleich zu unbehandelten Diskmembranen sind in Abhängigkeit vom erhöhten Cholesterolgehalt dargestellt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen).

Die oben beschriebenen Daten deuten auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Cholesterol und PC hin, da sich die verwendeten Phospholipidspinsonden nur durch die Kopfgruppen unterscheiden. Die Vermutung bestand, dass die Phospholipidspinsonde SL-PC nicht nur in ihrer Extrahierbarkeit sondern auch in ihrer Mobilität durch Cholesterol beeinflusst wird. Zur Klärung wurden ESR-Spektren von SL-PC in Diskmembranen mit 10 mol% bzw. 26 mol% bei 20 °C aufgenommen. In Abbildung 30 A sind beide Spektren dargestellt. Zum Vergleich ist ein theoretisches Beispiel für ESR-Spektren von Spinsonden mit unterschiedlicher Mobilität beigelegt (Abbildung 30 B). Das grüne Spektrum widerspiegelt eine geringere Mobilität als das schwarze, was sich in einer Verbreiterung der drei Linien äußert.

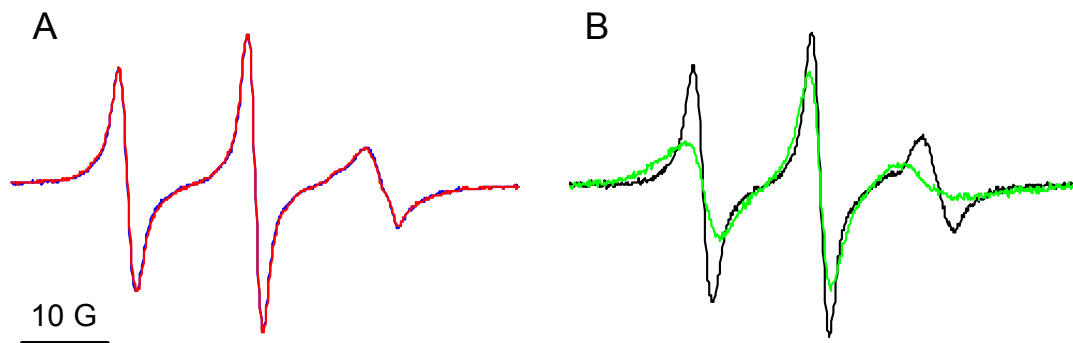


Abbildung 30: Spektrenvergleich von SL-PC in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

A Es sind die ESR-Spektren von SL-PC (1,4 mol%) in Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit 10 mol% (rot) und 26 mol% (blau) Cholesterolgehalt dargestellt. **B** Zum Vergleich wurde ein theoretisches Beispiel beigelegt (schwarze Linie entspricht einer höheren Mobilität der Spinsonde als die grüne Linie).

Die ESR-Spektren von SL-PC sind deckungsgleich und weisen keine Unterschiede in ihrer Form in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt auf. Daher kann nicht auf eine veränderte Mobilität der Spinsonde aufgrund von Interaktionen mit Cholesterol geschlossen werden.

3.6 Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die aktive Rezeptorkonformation

3.6.1 Meta II-Bildung

Nachdem Rhodopsin durch Licht aktiviert wurde, durchläuft der Rezeptor verschiedene Konformationsänderungen, bis er ein Gleichgewicht der beiden Metarhodopsinformen Meta I und Meta II erreicht. Dieses Gleichgewicht hängt vom pH-Wert, der Temperatur und der Lipidumgebung ab. Da die Eigenschaften der Lipidumgebung durch den Cholesterolgehalt verändert werden, wurde die Bildung von Meta II in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt in Diskmembranen untersucht.

Es wurden Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (7-26 mol% Cholesterol) bei pH 7,4 und 20 °C belichtet und die Bildung des Meta II photometrisch bei 380 nm verfolgt. Um Einflüsse der Lichtstreuung zu verhindern, wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet und die Differenz zur Absorption des isosbestischen Punktes (417 nm) gebildet.

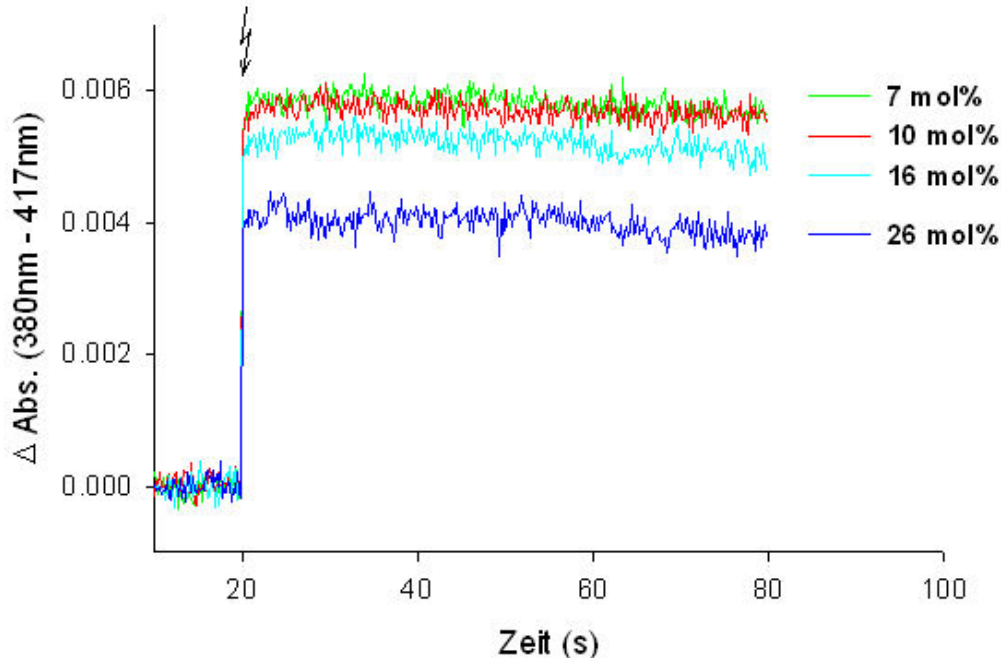


Abbildung 31: Meta II-Bildung in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die zeitabhängige Änderung der Absorptionsdifferenz der Meta II-Bildung ($\lambda = 380$ nm) zum isosbestischen Punkt des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes ($\lambda = 417$ nm) ist für Diskmembranen (10 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt dargestellt. Die Aktivierung von 19 % der Rezeptoren (Blitzsymbol) erfolgte durch einen Lichtblitz ($\lambda = 500 \pm 20$ nm).

In Abbildung 31 sind die Absorptionsdifferenzen zeitabhängig nach Aktivierung des Rezeptors (10 μ M Rhodopsin) dargestellt. Die Bildung von Meta II führt zu einem Anstieg der Absorptionsdifferenz durch Zunahme der Absorption bei 380 nm. Der Maximalwert wird innerhalb der ersten Sekunden erreicht und bleibt über den Zeitraum des Experimentes (60 s) konstant. Die Erhöhung des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen hat eine verminderte Meta II-Bildung zur Folge.

Die Abhängigkeit der Meta II-Bildung vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen ist in Abbildung 32 dargestellt. Dabei wurden die Werte, auf die Absorptionsdifferenz der unbehandelten Diskmembranen (10 mol% Cholesterol) normiert. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Meta II-Bildung in Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt. In Membranen mit 16 mol% Cholesterol ist die Meta II-Bildung um 6 ± 4 % vermindert, mit 26 mol% um 34 ± 13 %.

Führt man diese Messung bei pH 6,0 und 30 °C durch, so liegt das Meta I-Meta II-Gleichgewicht in unbehandelten Diskmembranen vollständig auf der Seite von Meta II (Parke und Liebman, 1984). Mit Hilfe der so ermittelten Absorptionsdifferenz (Daten nicht dargestellt) ist es möglich, den Meta II-Anteil bei pH 7,4 und 20 °C zu berechnen. Er beträgt in unbehandelten Diskmembranen 58 %. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol verringert sich der Meta II-Anteil auf 38 %.

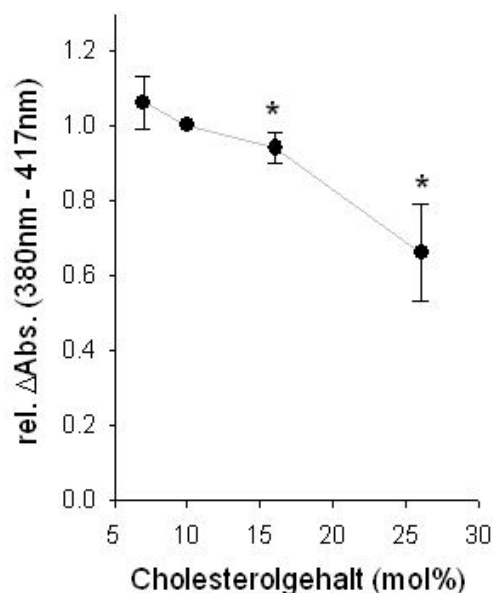


Abbildung 32: Meta II-Bildung in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

Die relativen Absorptionsdifferenzen, normiert auf die unbehandelten Diskmembranen, sind in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt dargestellt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens vier Experimenten (mind. drei unabhängige Membranpräparationen). * signifikant mit $p < 0,007$

Von Mitchell et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zum Meta II-Anteil auch die Geschwindigkeit der Meta II-Bildung von der Membranumgebung abhängig ist. Deshalb wurde die Geschwindigkeitsbestimmung der Meta II-Bildung in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt an einem Zweiwellenlängen-Blitzlicht-Photometer mit einer Zeitauflösung im Millisekundenbereich durchgeführt. In Abbildung 33 sind diese Ergebnisse dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Meta II Bildung bei pH 7,4 und 20 °C ist in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt identisch. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den beobachteten Geschwindigkeiten der Meta II-Bildung in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt ermittelt werden. Bei pH 7,4 und 20 °C beträgt die Halbwertszeit der Meta II-Bildung in unbehandelten Diskmembranen $9,4 \pm 0,4$ ms. Für Diskmembranen mit 7 mol% Cholesterol wurde eine Halbwertszeit von $10,2 \pm 1,1$ ms und mit 26 mol% von $10,5 \pm 1,3$ ms berechnet.

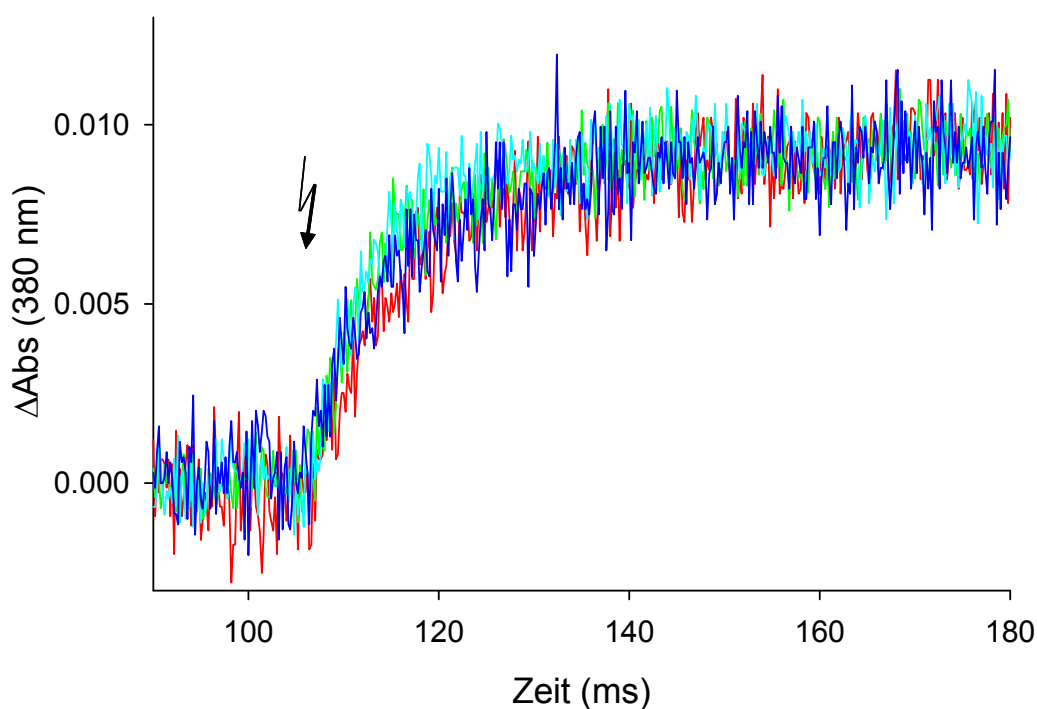
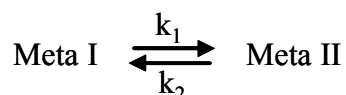


Abbildung 33: Zeitverlauf der Meta II-Bildung in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

In Diskmembranen (5 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde die Bildung von Meta II (380 nm) bei 20 °C verfolgt. Mit einem Lichtblitz (mit 490 bis 540 nm-Breitbandfilter, Blitzsymbol) wurden 11 % des Rhodopsin aktiviert. Die Kurven wurden auf die Amplituden normiert (rot: 10 mol%, grün: 7 mol%, cyan: 16 mol%, blau: 26 mol%).

Das Meta I-Meta II-Gleichgewicht kann man als Gleichgewichtsreaktion erster Ordnung beschreiben (siehe Reaktionsschema). Demzufolge können die Geschwindigkeitskonstanten der Meta I- (k_2) bzw. Meta II-Bildung (k_1) aus der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} berechnet werden.



Im Gleichgewicht gilt: $[\text{Meta II}] = [\text{Meta I}] \left(1 - e^{-(k_1 + k_2)t}\right)$ mit $k_{\text{obs}} = k_1 + k_2$. Die Gleichgewichtskonstante K_{eq} berechnet sich aus dem Verhältnis der Anteile an Meta II zu Meta I. Die so berechneten Parameter des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes wurden in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Parameter des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes

Dargestellt sind die Parameter des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes von Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante; k_1 : Geschwindigkeitskonstante der Meta II-Bildung; k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Meta I-Bildung; K_{eq} : Gleichgewichtskonstante.

Cholesterolgehalt der Diskmembranen (mol%)	Geschwindigkeitskonstanten (ms^{-1})			rel. Meta II-Anteil	Gleichgewichtskonstante K_{eq}
	k_{obs}	k_1	k_2		
7	0,068	0,041	0,028	0,593	1,46
10	0,074	0,043	0,031	0,578	1,37
16	0,084	0,045	0,038	0,541	1,18
26	0,067	0,026	0,041	0,384	0,62

Mit zunehmenden Cholesterolgehalt der Diskmembranen nimmt der Meta II-Anteil ab, d.h. das Meta I-Meta II-Gleichgewicht verschiebt sich zu Gunsten von Meta I. Dabei verringert sich die Gleichgewichtskonstante von 1,46 (bei 7 mol% Cholesterol) auf 0,62 (bei 26 mol%

Cholesterol). Ebenso wird die Geschwindigkeitskonstante der Meta II-Bildung von $0,041 \text{ ms}^{-1}$ (7 mol%) auf $0,026 \text{ ms}^{-1}$ (26 mol%) verringert.

3.6.2 Meta II-Bildung in Anwesenheit von Transducin

Das Meta I-Meta II-Gleichgewicht wird durch die Anwesenheit des G-Proteins zu Gunsten von Meta II verändert, da es zu einer Komplexbildung von Transducin mit der aktiven Rezeptorkonformation Meta II kommt (Emeis und Hofmann, 1981). Der Einfluss des Cholesterols auf diesen als *Extra Meta II* bezeichneten Effekt wurde an Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt untersucht.

Diskmembranen (10 μM Rhodopsin) wurden mit 1 μM , 1,75 μM bzw. 3,5 μM Transducin bei pH 7,4 und 20 °C vier Minuten inkubiert und anschließend belichtet ($\lambda = 500 \pm 20 \text{ nm}$). Die Aufzeichnung der Absorptionsdifferenz von 380 nm zu 417 nm erfolgte zeitabhängig. Die auf die unbehandelten Diskmembranen normierten Absorptionsdifferenzen sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Unterschiede im Meta II-Anteil aufgrund des unterschiedlichen Cholesterolgehaltes der Diskmembranen nehmen mit steigender Transducinkonzentration ab. D.h. in Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol wird die Differenz im Meta II-Anteil im Vergleich zu unbehandelten Diskmembranen von 34 % (ohne Transducin) durch Zugabe von 3,5 μM Transducin auf 6 % erniedrigt.

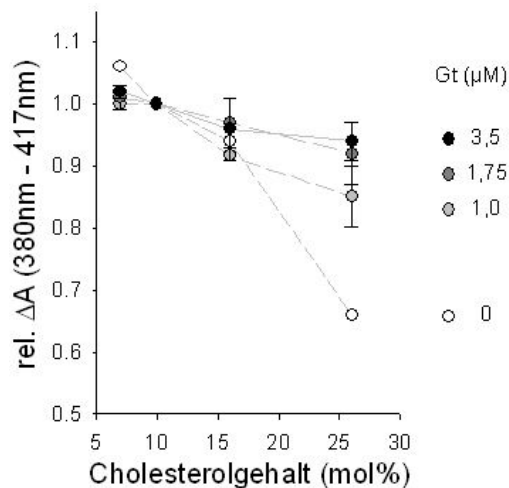


Abbildung 34: *Extra Meta II* in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die relativen Absorptionsdifferenzen der Meta II-Bildung in Diskmembranen (10 μM Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C, 19 % aktivierter Rezeptor) sind in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen für verschiedene Transducinkonzentrationen (Gt; \circ , 0 μM ; \bullet , 1 μM ; \bullet , 1,75 μM ; \bullet , 3,5 μM) dargestellt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen), 0 μM Gt ohne Standardabweichung.

3.7 Wechselwirkungen von Transducin mit Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

3.7.1 Dunkelbindung von Transducin an Diskmembranen

Das G-Protein Transducin ist ein peripheres Membranprotein des Stäbchenaußensegmentes. Dessen Wechselwirkungen mit Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe der zeitaufgelösten Lichtstreuung im nahen Infrarotbereich untersucht. Dafür erfolgte die Messung von zwei verschiedenen Signalen, dem Bindungs- und dem Dissoziationssignal. Mit diesen Signalen können Aussagen über die Membranbindung und die Aktivierung von Transducin gemacht werden.

Zur Messung des Bindungssignales wurden Diskmembranen (3 μM Rhodopsin in Puffer 3) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit Transducin (0,6 μM) gemischt. Das Lichtstreuungssignal wurde vor und nach der Aktivierung von 32 % des Rhodopsins durch einen Lichtblitz ($\lambda = 500 \pm 20 \text{ nm}$) aufgezeichnet. Die lichtinduzierte Bindung von Transducin an die Membran führte zu einem Anstieg der Steuintensität (Abbildung 35 A, Spur a), dessen Plateau nach 40-50 Sekunden erreicht wurde. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der maximalen Amplitude vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen. Mit steigendem Cholesterolgehalt nahm die Amplitude des Signales ab (Abbildung 35 und B, Spur a).

Die Messung des Dissoziationssignales erfolgte durch Belichtung einer Diskmembransuspension (3 μM Rhodopsin in Puffer 3, 0,6 μM Transducin, 0,5 mM GTP und 2,5 mM Hydroxylamin), wobei die Aktivierung von 0,5 % des Rhodopsins zu einer abnehmenden Streuintensität führte. Ein deutlicher Unterschied in den Geschwindigkeiten zwischen Bindungs- und Dissoziationssignal ist zu erkennen (Abbildung 35 A). Das Bindungssignal ist um eine Größenordnung langsamer. Vergleichbar zum Bindungssignal zeigten die Dissoziationssignale eine Abhängigkeit der Amplituden vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen. Jedoch nahm die Amplitude mit steigendem Cholesterolgehalt zu (Abbildung 35 A und B, Spur b).

Da das Bindungssignal die Membranbindung des löslichen Transducin-Anteils und das Dissoziationssignal die Dissoziation des membrangebundenen Transducin-Anteils beschreiben, können aus dem Verhältnis der Amplituden beider Signale die Anteile der löslichen und membrangebundenen Transducin-Fractionen in den unbelichteten Diskmembranen berechnet werden (Heck et al., 2000), veranschaulicht durch die Doppelpfeile in Abbildung 35. In unbelichteten und unbelichteten Diskmembranen (10 mol% Cholesterol) sind $46 \pm 13 \%$ der

Transducinmoleküle membrangebunden. In Diskmembranen mit 7 mol% Cholesterol ist der membrangebundene Anteil von Transducin gegenüber den unbehandelten Diskmembranen um $23 \pm 7\%$ vermindert. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol ist er dagegen um $38 \pm 19\%$ erhöht (Abbildung 36).

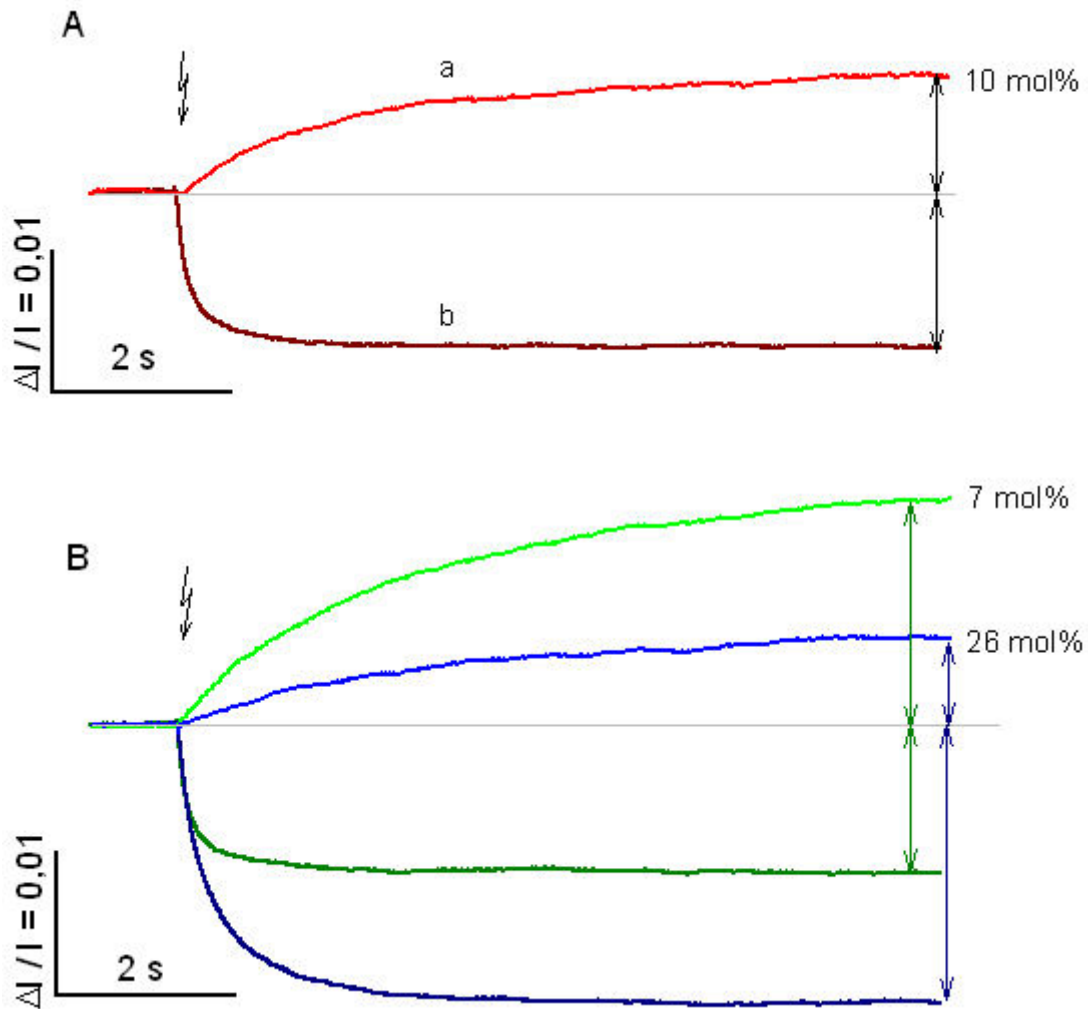


Abbildung 35: Lichtstreusignale von Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die Lichtstreusignale von Diskmembranen ($3\ \mu\text{M}$ Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, $20\ ^\circ\text{C}$) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt sind als relative Intensitäten ($\Delta I/I_0$) zeitabhängig dargestellt. Bindungssignal (Spur a): $0,6\ \mu\text{M}$ Transducin, 32 % aktivierter Rezeptor (Blitzsymbol); Dissoziationssignal (Spur b): $0,6\ \mu\text{M}$ Transducin, $0,5\ \text{mM}$ GTP, $2,5\ \text{mM}$ Hydroxylamin, 0,5 % aktivierter Rezeptor; **A:** Diskmembranen mit 10 mol% Cholesterol, **B:** Diskmembranen mit 7 mol% (grün) bzw. 26 mol% (blau) Cholesterol. Die Doppelpfeile dienen der Darstellung der Amplitudenunterschiede, wobei die Bindungssignale in den hier gezeigten Beispielen erst 70 % der maximalen Amplitude erreicht haben. Für die Auswertung wurden die vollständigen Datensätze benutzt.

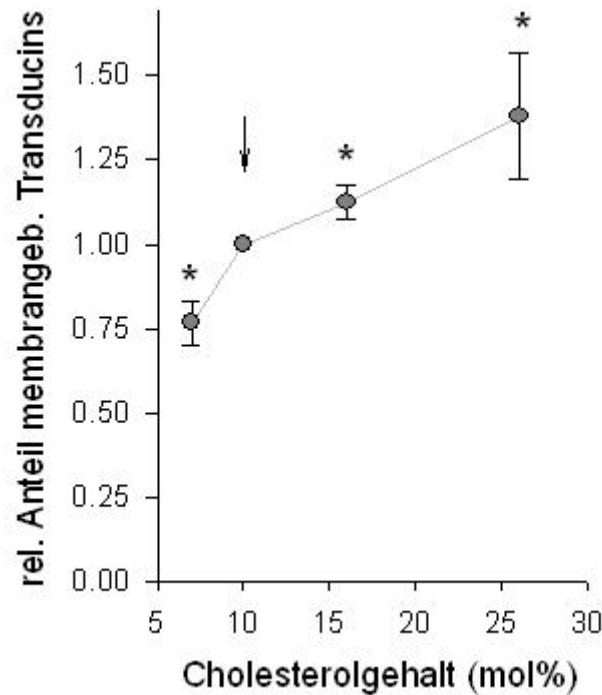


Abbildung 36: Membranbindung von Transducin – berechnet aus den Lichtstreuemessungen

Die relativen Anteile von membrangebundenem Transducin normiert auf unbehandelte Diskmembranen (Pfeil) wurden aus dem Verhältnis der Amplituden des Bindungs- und Dissoziationssignals berechnet (siehe Abbildung 35). * signifikant mit $p \leq 0,002$

Die Membranbindung von Transducin kann zusätzlich mit einem Zentrifugationsexperiment bestimmt werden. Dafür wurden Diskmembranen (3 μM Rhodopsin in Puffer 3) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit Transducin (0,6 μM) für vier Minuten bei 20°C unter Rotlicht inkubiert. Die Trennung des membrangebundenen Transducin-Anteils vom löslichen erfolgte durch eine Zentrifugation (2 min, 50000 g, 20 °C). Die so präparierten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden eingefärbt. Der Transducin-Anteil in den Proben konnte mit Hilfe eines Densitometrieprogrammes (TINA Raytest Isotope Messgeräte, GmbH) bestimmt werden. In unbehandelten und unbelichteten Diskmembranen wurde ein membrangebundener Transducin-Anteil von $47 \pm 5 \%$ ermittelt, was das Ergebnis der Lichtstreuemessungen bestätigt.

Die Abhängigkeit der Membranbindung vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen zeigt den gleichen Zusammenhang wie die Lichtstreuemessungen, ist aber weniger ausgeprägt. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol ergab sich eine signifikante Erhöhung der Membranbindung um $20 \pm 9 \%$. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Lichtstreuemessung und des Zentrifugationsexperimentes haben wahrscheinlich methodische Gründe, da beide

Methoden jeweils am gleichen Tag mit den gleichen Membran- und Proteinpräparationen durchgeführt wurden.

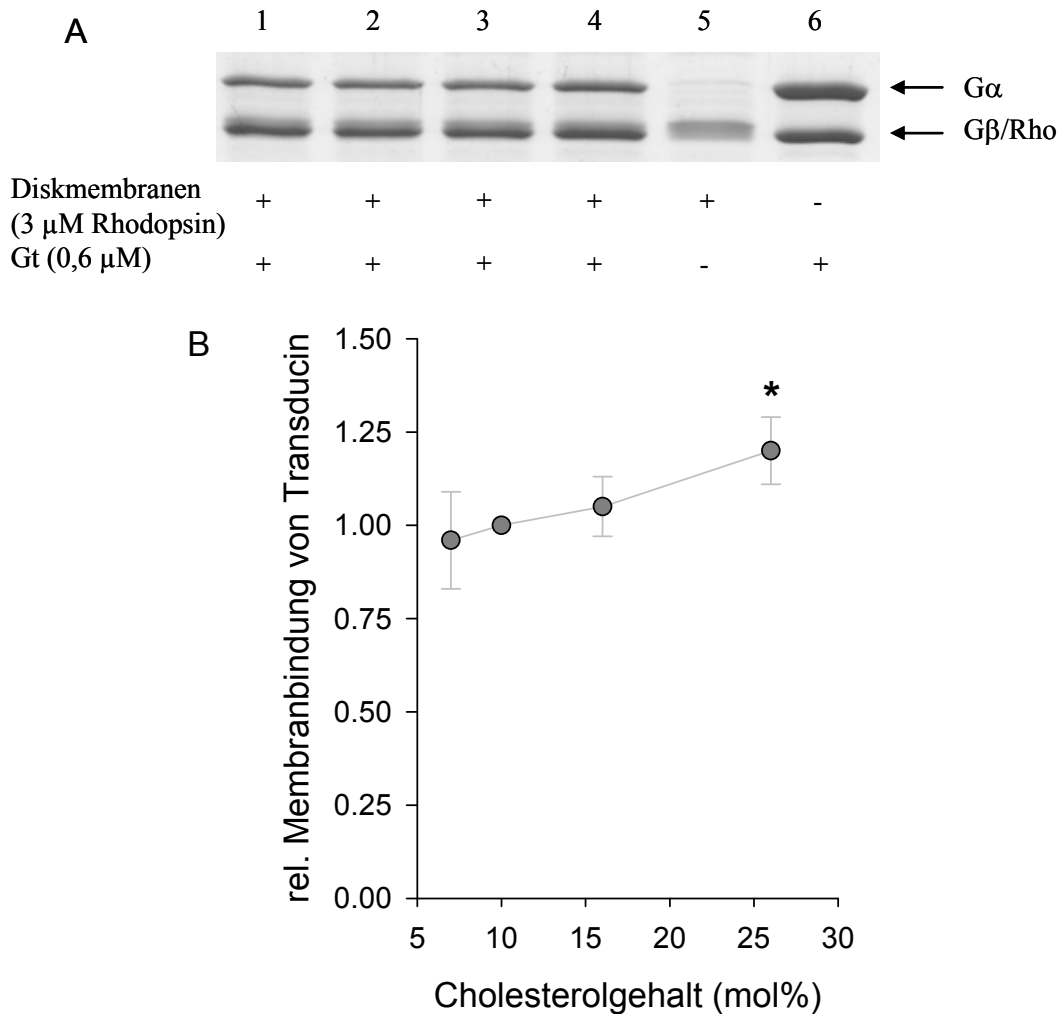


Abbildung 37: Membranbindung von Transducin – Zentrifugationsexperiment

Die Bindung von Transducin an Diskmembranen (3 μM Rhodopsin in Puffer 3, 0,6 μM Gt, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsexperimentes (2 min, 50000 g, 20 °C) untersucht. Die Diskmembranen wurden vier Minuten mit Transducin inkubiert. **A:** Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. 1: 7 mol% Cholesterol, 2: 10 mol%, 3: 16 mol%, 4: 26 mol%, 5: Diskmembranen ohne Transducin, 6: Transducin (0,6 μM). Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgte über einen Molekulargewichtsmarker (2.8.2). **B:** densitometrische Auswertung der SDS-Gele normiert auf den membrangebundenen Transducin-Anteil der unbehandelten Diskmembranen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens fünf Experimenten (mind. fünf unabhängige Membranpräparationen), * signifikant mit $p < 0,001$

3.7.2 Geschwindigkeit der Transducinaktivierung in Diskmembranen

Die Geschwindigkeiten des Bindungs- und Dissoziationssignals wurden aus dem Anstieg der ersten 20-30 Datenpunkten bezogen auf die Amplitude ermittelt (Abbildung 38, schwarze

Linie). In Abbildung 38 sind die ersten 0,5 Sekunden der Dissoziationssignale von Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (auf die Amplituden normiert) dargestellt. Eine deutliche Abnahme der Geschwindigkeit mit steigendem Cholesterolgehalt ist zu erkennen. In Diskmembranen mit 7 mol% Cholesterol ist die Dissoziation von Transducin um $10 \pm 6 \%$ beschleunigt, in Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol dagegen um $43 \pm 7 \%$ verlangsamt (Abbildung 39 B). Auf die Geschwindigkeit des Bindungssignals hat der Cholesterolgehalt der Diskmembranen keinen Einfluss (Abbildung 39 A).

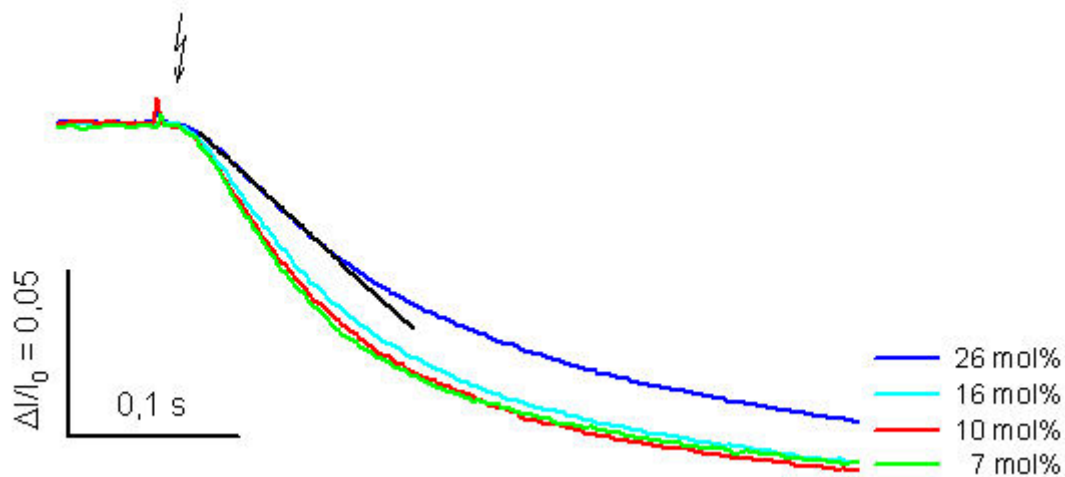


Abbildung 38: Vergleich der Geschwindigkeiten der Dissoziationssignale in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die Dissoziationssignale in Diskmembranen ($3 \mu\text{M}$ Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20°C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt in mol% (siehe Abbildung 35) wurden auf die Amplitude normiert, um die Unterschiede in den Geschwindigkeiten darzustellen. Blitzsymbol: Aktivierung von 0,5 % der Rezeptoren durch einen Lichtblitz ($\lambda = 500 \pm 20 \text{ nm}$). Die schwarze Gerade zeigt den maximalen Anstieg exemplarisch für Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol.

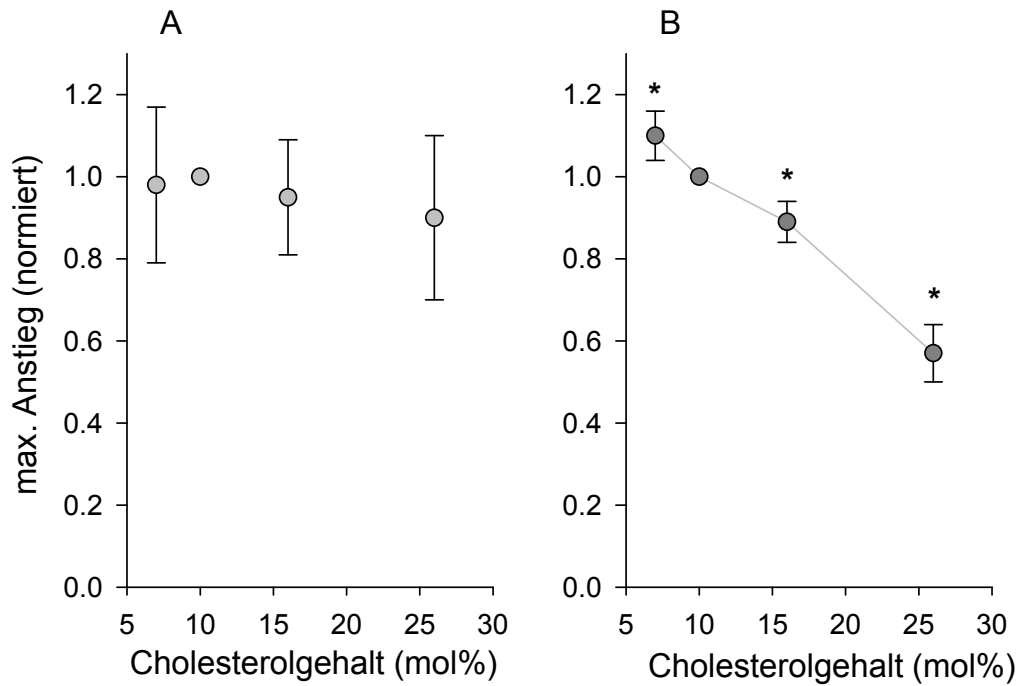


Abbildung 39: Geschwindigkeiten der Lichtstreuesignale

A: Bindungssignal, B: Dissoziationssignal, Die Anstiege der Lichtstreuesignale wurden aus den ersten 20-30 Datenpunkten mittels linearer Regression ermittelt und durch die Amplitude geteilt. Die relativen Geschwindigkeiten, normiert auf die unbehandelten Diskmembranen (10 mol%) sind dargestellt. * signifikant mit $p \leq 0,001$

3.8 Wechselwirkungen der PDE mit Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

3.8.1 Membranbindung der PDE

Die cGMP-spezifische Phosphodiesterase des Stäbchenaußensegmentes (PDE) ist ein peripheres Membranprotein mit Lipidmodifikationen. In einer Membransuspension bindet nur ein Teil der PDE-Moleküle an die Membran, ein Teil bleibt in Lösung (Catty et al., 1992). Der Einfluss des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen auf die Membranbindung der PDE wurde ohne Lichtaktivierung des Rezeptors (Dunkelbindung) untersucht.

Die Membranbindung der PDE wurde mit einem Zentrifugationsexperiment bestimmt. In Abbildung 40 sind die Proteinbanden (A) und die Ergebnisse des Zentrifugationsexperimentes normiert auf die unbehandelten Diskmembranen (10 mol% Cholesterol) (B) dargestellt. In unbehandelten Diskmembranen sind 46 ± 11 % der PDE-Moleküle membrangebunden. Der

membrangebundene Anteil der PDE nimmt mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen zu. Bei einem erhöhten Cholesterolgehalt von 26 mol% sind ca. 33 % mehr PDE-Moleküle membrangebunden als in den unbehandelten Diskmembranen (10 mol% Cholesterol). Dagegen verringert sich dieser PDE-Anteil in Diskmembranen mit nur 7 mol% Cholesterol um 6 %.

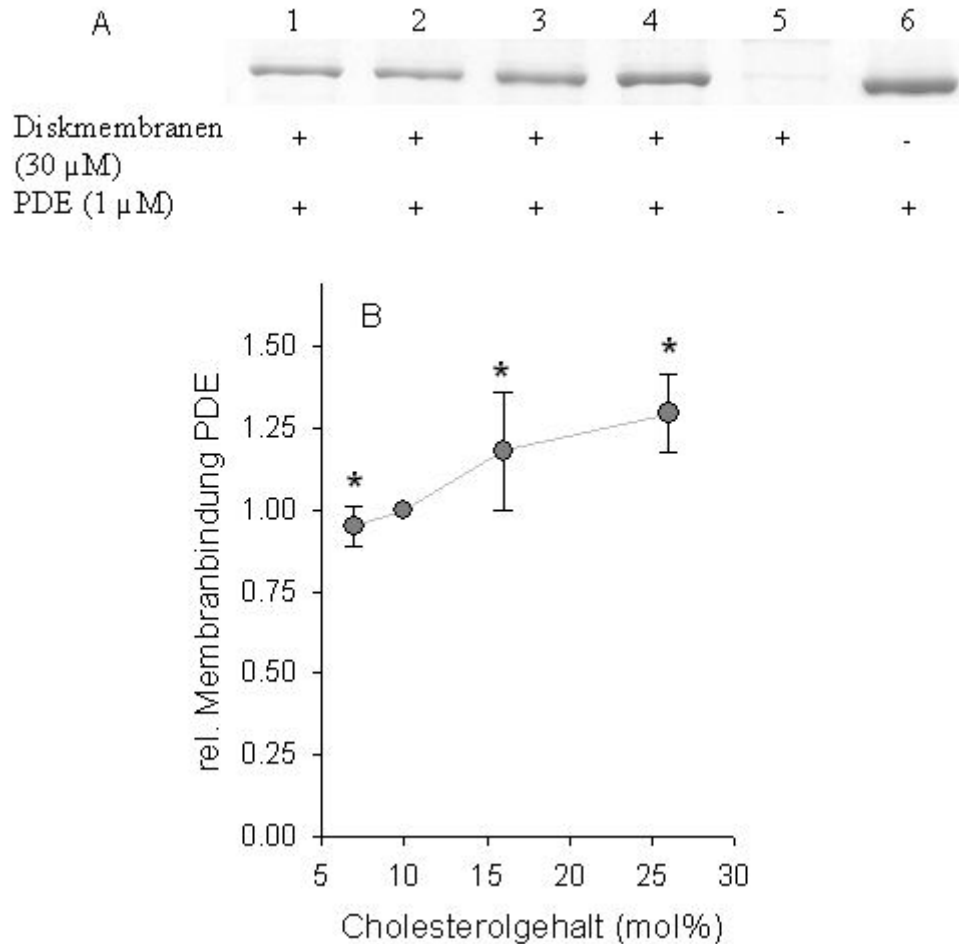


Abbildung 40: Membranbindung der PDE:

Die Dunkelbindung der PDE an Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, 1 μ M PDE, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsexperimentes (2 min, 50000 g, 20 °C) untersucht. Die Diskmembranen wurden zehn Minuten unter Rotlicht mit der PDE inkubiert. **A:** Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. 1: 7 mol% Cholesterol, 2: 10 mol%, 3: 16 mol%, 4: 26 mol%, 5: Diskmembranen ohne PDE, 6: PDE (1 μ M). Die Zuordnung der Proteinbanden erfolgte über einen Molekulargewichtsmarker (2.8.2). **B:** densitometrische Auswertung der SDS-Gele normiert auf den membrangebundenen PDE-Anteil der unbehandelten Diskmembranen. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens vier Experimenten (mind. vier unabhängige Membranpräparationen), * signifikant mit $p < 0,039$.

3.8.2 Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga

Die PDE kann die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga durch BSA kopfgruppenspezifisch beeinflussen (Hessel et al., 2003). Deshalb wurde die Abhängigkeit der Wechselwirkung der PDE mit den Phospholipiden PC und PE vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen untersucht.

Die spinmarkierten Phospholipidanaloga SL-PC und SL-PE wurden in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (7-26 mol%) eingebaut und deren Extrahierbarkeit durch BSA nach Zugabe von PDE zeitabhängig verfolgt. In Abbildung 41 ist der zeitliche Verlauf der Extrahierbarkeit von SL-PC mit und ohne PDE (1 μ M) in unbehandelten Diskmembranen dargestellt.

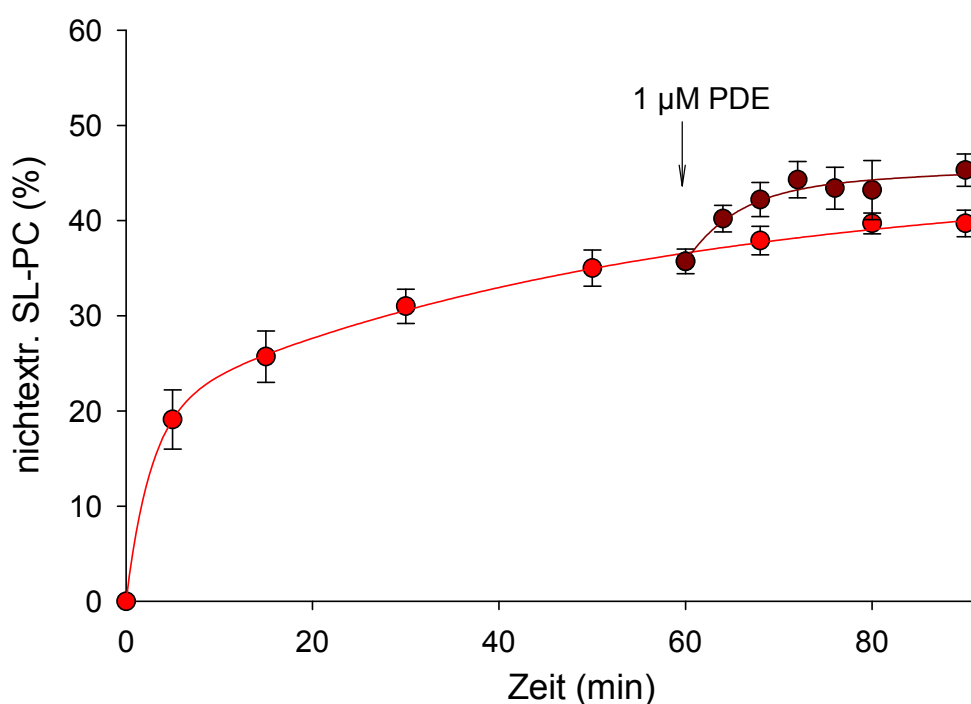


Abbildung 41: Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von SL-PC durch BSA

Der zeitliche Verlauf der Extrahierbarkeit von SL-PC (1,4 mol%) durch BSA aus unbehandelten Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 $^{\circ}$ C) ist dargestellt. Zum Zeitpunkt Null erfolgte die Zugabe von SL-PC zur Membransuspension, nach 60 Minuten wurde einem Teil der Membransuspension PDE (1 μ M, dunkelrot) zugegeben. Die Daten zeigen den SL-PC-Anteil, welcher sich nach Inkubation mit BSA und Zentrifugation (2 min, 50000 g, 4 $^{\circ}$ C) im Pellet befand und aus der Vermessung des Mittelfeldpeaks des ESR-Spektrums resultierte. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen). Die Linien sind Anpassungen der Daten an eine exponentielle Funktion.

Nach Einbau von SL-PC in die Diskmembranen steigt der durch BSA nichtextrahierbare Spinsondenanteil exponentiell an und erreicht nach etwa 60 Minuten seinen maximalen Wert. Dieser Prozess beschreibt die Einwärtsbewegung der Spinsondenmoleküle in die innere Membranschicht (Hessel et al., 2000). Das Erreichen des Plateaus weist auf eine Gleichgewichtsverteilung der Spinsondenmoleküle zwischen den beiden Lipidschichten der Membran. Die Zugabe von PDE führte zu einem zusätzlichen Anstieg des nichtextrahierbaren Spinsondenanteils. Die Abnahme der Extrahierbarkeit in Anwesenheit von PDE erreicht nach etwa zehn Minuten einen konstanten Wert von ca. 5 %. Dies entspricht der beschriebenen Wechselwirkung von SL-PC mit der PDE (Hessel et al., 2003).

In den Abbildung 42 und Abbildung 43 sind die Änderungen der Extrahierbarkeit von SL-PC und SL-PE durch Zugabe von PDE zur Membransuspension für die verschiedenen Cholesterolgehalte der Diskmembranen dargestellt. Für eine bessere Übersichtlichkeit wird nur der Bereich der PDE-Inkubation gezeigt.

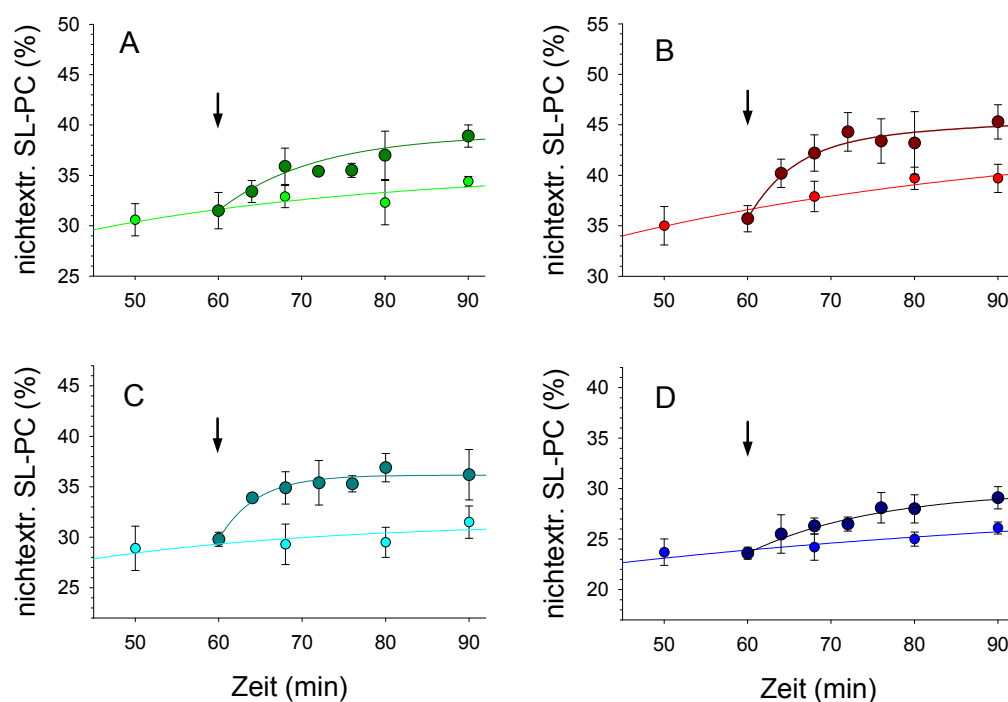


Abbildung 42: Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von SL-PC durch BSA in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen

Der zeitliche Verlauf der Extrahierbarkeit von SL-PC durch BSA aus Diskmembranen (30 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (A 7 mol% grün; B 10 mol% rot; C 16 mol%, cyan; D 26 mol%, blau) ist für einen Zeitbereich von 45-90 Minuten nach Spinsondenzugabe dargestellt. Die Zugabe der PDE (1 μ M, Pfeilsymbol) erfolgte nach 60 Minuten. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen). Die Linien sind Anpassungen der Daten an eine exponentielle Funktion.

Die Zugabe von 1 μM PDE führte in Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 7-16 mol% zu einer Erhöhung des nichtextrahierbaren Spinsondenanteils von SL-PC von 4-5 %. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol ist dieser Spinsondenanteil mit etwa 3 % signifikant verringert. Auf die verminderte Extrahierbarkeit von SL-PE nach Zugabe der PDE hat der Cholesterolgehalt von Diskmembranen keinen Einfluss. In allen untersuchten Membranen wurden 4-6 % der Spinsonden in ihrer Extrahierbarkeit verringert. Die exakten Werte der veränderten Extrahierbarkeit von SL-PC und SL-PE sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Weiterhin wurde die Anzahl der Phospholipide berechnet, die durch ein PDE-Molekül beeinflusst wurden.

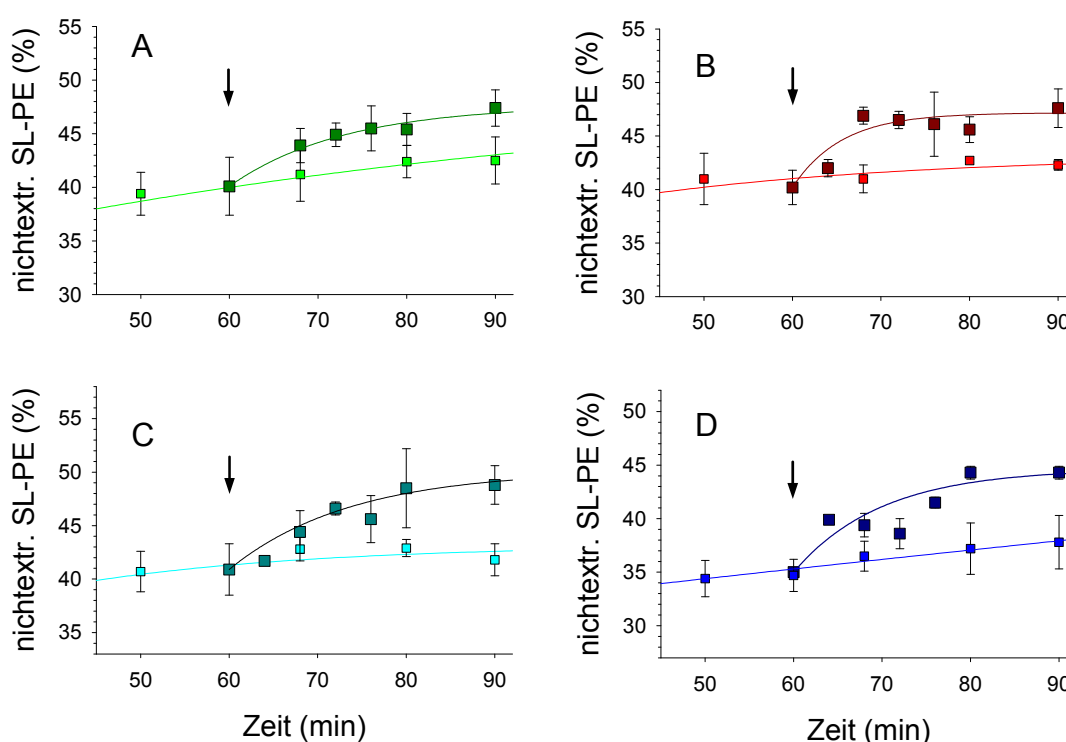


Abbildung 43: Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von SL-PE durch BSA in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen

Der zeitliche Verlauf der Extrahierbarkeit von SL-PE (1,4 mol%) durch BSA aus Diskmembranen (30 μM Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (A 7 mol%, grün; B 10 mol%, rot; C 16 mol%, cyan; D 26 mol%, blau) ist für einen Zeitbereich von 45-90 Minuten nach Spinsondenzugabe dargestellt. Die Zugabe der PDE (1 μM , Pfeilsymbol) erfolgte nach 60 Minuten. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen). Die Linien sind Anpassungen der Daten an eine exponentielle Funktion.

Folglich hat der Cholesterolgehalt der Diskmembranen keinen Einfluss auf die veränderte Extrahierbarkeit von SL-PE und SL-PC nach Zugabe der PDE (Tabelle 7). In Diskmembranen werden unabhängig vom Cholesterolgehalt etwa 80-100 Phospholipide pro PDE-

Molekül beeinflusst. Die signifikante Abnahme des nach PDE-Zugabe in seiner Extrahierbarkeit veränderten Spinsondenanteils von SL-PC in Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 26 mol% könnte mit der veränderten Extrahierbarkeit von SL-PC auch ohne PDE-Zugabe zusammenhängen (siehe 3.5).

Tabelle 7: Extraktionsunterschiede von SL-PC und SL-PE nach Zugabe von PDE

Die Extraktionsdifferenzen der spinmarkierten Phospholipidanaloga SL-PC und SL-PE nach Zugabe der PDE sind in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen zusammengefasst. Die Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten (* signifikant mit $p \leq 0,001$).

Cholesterolgehalt von Diskmembranen (mol%)	Extraktionsdifferenz der spinmarkierten Phospholipidanaloga nach Zugabe von PDE (%)		Phospholipide pro PDE
	SL-PC	SL-PE	
7	$4,0 \pm 2,1$	$4,4 \pm 1,7$	77 ± 34
10	$5,2 \pm 2,1$	$5,7 \pm 1,9$	99 ± 37
16	$4,9 \pm 1,7$	$4,4 \pm 2,4$	85 ± 37
26	$3,1 \pm 1,1^*$	$6,1 \pm 2,3$	83 ± 30

3.8.3 Einfluss des Cholesterolgehaltes von Diskmembranen auf die Aktivität der PDE

Die Aktivität der PDE ist in großem Maße von der Anwesenheit von Membranen abhängig (Malinski und Wensel, 1992). In Kapitel 3.8.1 konnte gezeigt werden, dass die Membranbindung der PDE mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen zunimmt. Daher folgten Untersuchungen zur Abhängigkeit der PDE-Aktivität vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen. Die Aktivität der Phosphodiesterase kann mit einer zeitaufgelösten pH-Messung bestimmt werden (Yee und Liebman, 1978; Heck und Hofmann, 1993). Dies beruht auf der enzymatischen Hydrolyse des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) zu GMP durch die aktivierte PDE ($\text{PDE} - \text{G}\alpha_{\text{GTP}}^*$), wobei pro cGMP-Molekül ein Proton freigesetzt wird (siehe Reaktionsschema).



Es wurden Diskmembranen (5 μM Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit der PDE (50 nM) und Transducin (0,6 μM) bei 20 °C inkubiert. Die Zugabe von GTP γ S (200 μM) führte nach Belichtung der Protein-Membransuspension zu einer dauerhaften Aktivierung von Transducin. Die Veränderung des pH-Wertes der Suspension nach Zugabe von cGMP (3 mM) wurde zeitabhängig gemessen. Die PDE-Aktivitätsbestimmung erfolgte aus dem Anstieg der pH-Kurven, wie sie in Abbildung 44 dargestellt sind.

Die PDE-Aktivität ist in Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 7 mol% mit 620 ± 90 cGMP/s·PDE am geringsten. Das entspricht einer Abnahme um 8 ± 6 % gegenüber den unbehandelten Diskmembranen (10 mol% Cholesterol) (Abbildung 45). In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol ist die PDE-Aktivität mit 782 ± 35 cGMP/s·PDE am höchsten. Das entspricht einem Aktivitätsanstieg um 17 ± 8 %.

Zum Vergleich ist die Bestimmung der PDE-Aktivität mit nur 25 nM Rhodopsin in unbehandelten Diskmembranen dargestellt. Sie ist wie erwartet mit etwa 60 cGMP/s·PDE deutlich geringer und demonstriert somit die Abhängigkeit der PDE-Aktivität von der Anwesenheit von Membranen. Diese 200-fach geringere Menge Diskmembranen entspricht einer Lipidkonzentration von etwa 1,75 μM bzw. einem PDE:Phospholipidverhältnis von 1:35.

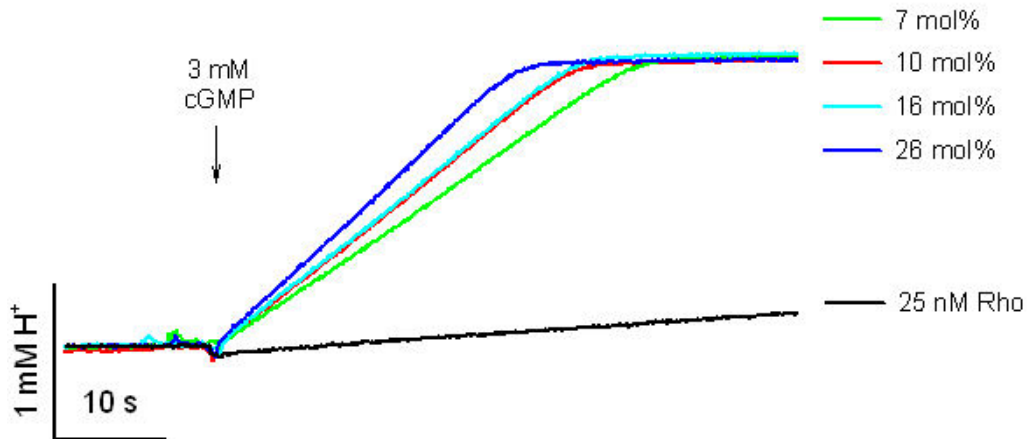


Abbildung 44: Messung der PDE-Aktivität in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Die PDE-Aktivität wurde in Diskmembranen (5 μ M Rhodopsin in Puffer 3, pH 7,4, 20 °C) mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (7-26 mol%) und in stark verdünnten Diskmembranen (25 nM Rhodopsin) mittels pH-Wert-Messung bestimmt. Die PDE (50 nM), Transducin (0,6 μ M) und GTP γ S (200 μ M) wurden mit den Membranen gemischt und belichtet (100 % aktivierter Rezeptor). Nach Aufzeichnung der Grundlinie erfolgte die Zugabe von 3 mM cGMP.

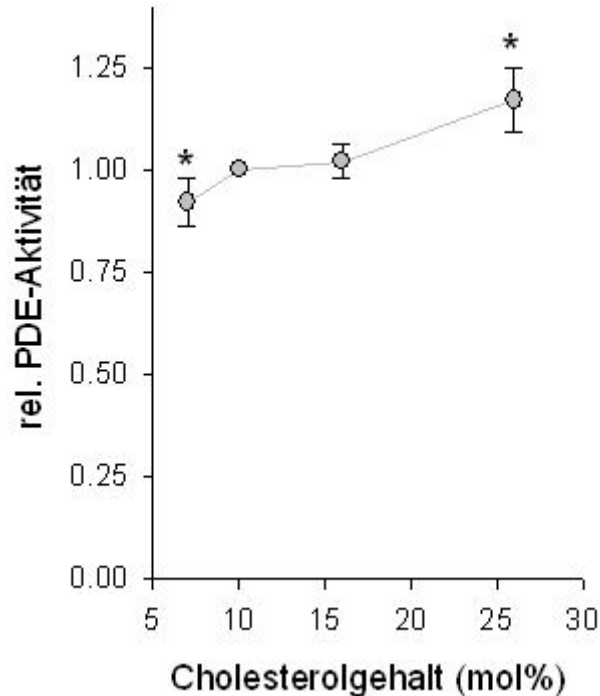


Abbildung 45: Relative PDE-Aktivität in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen

Die bestimmten PDE-Aktivitäten, wie in Abbildung 44 beschrieben, wurden auf die unbehandelten Diskmembranen normiert. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens fünf Experimenten (mind. zwei unabhängige Membranpräparationen). * signifikant mit $p < 0,02$

4 Diskussion

In den vorherigen Kapiteln wurden experimentelle Ergebnisse vorgestellt, die der Untersuchung des Einflusses des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen auf die ersten Schritte der visuellen Signaltransduktion dienten. Dafür ist ein Verständnis über die Verteilung und Beweglichkeit des Cholesterols in der Membran nötig, um Wechselwirkungen der Proteine der Signalkaskade mit der Diskmembran in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt besser erklären und verstehen zu können. Die Besonderheiten der Diskmembran, wie der sehr hohe Proteingehalt mit ca. 25000 Molekülen pro μm^2 (Pugh und Lamb, 2000) und der ungewöhnlich hohe Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Phospholipiden (Stinson et al., 1991) spielen dabei eine große Rolle. Der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Proteine Rhodopsin, Transducin und die Phosphodiesterase werden im Folgenden auf der Grundlage der erhobenen Daten diskutiert. Dazu werden einleitend die Eigenschaften der untersuchten Diskmembranen erläutert.

4.1 Die Verteilung und Beweglichkeit von Cholesterol in Diskmembranen

4.1.1 Die unterschiedlichen Cholesterolanaloga

Die Elektronenspinresonanz bietet in Verbindung mit spinmarkierten Lipiden eine Möglichkeit, das Verhalten von einzelnen Lipidarten in deren nativer Umgebung zu untersuchen. Es standen drei verschiedene, spinmarkierte Cholesterolanaloga zur Verfügung, die in die Diskmembranen eingebaut werden konnten. Deren Reduktion wurde zeitabhängig in Diskmembranen verfolgt, um Aussagen über die transversale Verteilung und die Beweglichkeit des Cholesterols treffen zu können.

Als Reduktionsmittel wurden Askorbat und 6-O-Phenylaskorbat verwendet, auf deren Unterschiede später näher eingegangen wird. Alle Reduktionen von SL-Cholesterol, SL-Cholestan und SL-Androstan in Diskmembranen durch Askorbat bzw. 6-O-Phenylaskorbat konnten durch biexponentielle Funktionen beschrieben werden (3.1). Ein mögliches Modell wurde von Müller und Herrmann (2002) in Erythrozytenmembranen und Liposomen erläutert. Das Modell beschreibt eine schnelle Komponente als Reduktion des Spinsondenanteils, der sich nach Zugabe des Reduktionsmittels in der äußeren Lipidschicht der Membran befindet und somit

dem Reduktionsmittel unmittelbar zugänglich ist. Die langsamere Komponente beinhaltet die Reduktion des Spinsondenanteils, der sich in der inneren Lipidschicht der Membran befindet. Durch eine Transmembranbewegung gelangt dieser Anteil in die äußere Hälfte, um dort reduziert werden zu können. Unterscheiden sich die Geschwindigkeiten der Reduktion und der Transmembranbewegung um mindestens eine Größenordnung, lässt sich sowohl die Verteilung des untersuchten Moleküls zwischen den beiden Lipidschichten als auch die Geschwindigkeit der Transmembranbewegung ermitteln.

Wendet man dieses Modell auf die Reduktionen der drei genannten Cholesterolanaloge an, so zeigen sich sehr unterschiedliche Ergebnisse, zum einen im Vergleich der Moleküle untereinander, zum anderen im Vergleich der beiden verwendeten Reduktionsmittel. Auf beide Aspekte wird im Folgenden genauer eingegangen.

(1) Die verschiedene Struktur der spinmarkierten Cholesterolanaloge: Die Cholesterolanaloge unterscheiden sich in ihrer Struktur bezüglich der Bindungsstelle der Spinsonde, einer Doxylgruppe und im Fall von SL-Androstan durch das Fehlen der Fettsäurekette (Abbildung 12). Diese strukturellen Unterschiede können zu einer veränderten Orientierung in der Membran führen. Dies kann sowohl die Eindringtiefe in die Membran als auch die Richtung des Moleküls betreffen (Scheidt et al., 2003). SL-Cholesterol spiegelt das Verhalten des nativen Cholesterols am besten wider. Sowohl seine Orientierung in der Membran als auch der Einfluss auf die Beweglichkeit der Phospholipidfettsäureketten entsprechen dem nativen Cholesterol, was mit Hilfe von NMR-Messungen gezeigt wurde (Scheidt et al., 2003). SL-Cholestan ist ebenfalls ähnlich dem nativen Cholesterol in der Membran orientiert, befindet sich aber etwas tiefer darin (Scheidt et al., 2003), da die Hydroxylgruppe durch die Doxylgruppe ersetzt wurde, was die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Kopfgruppen der Phospholipide vermindert. SL-Androstan scheint umgekehrt in die Membran eingebaut zu sein, da sich eine Hydroxylgruppe an der Position der Fettsäurekette und die Doxylgruppe an der Stelle der Hydroxylgruppe befinden. Beide haben einen deutlich geringeren Einfluss auf die Membranordnung (Scheidt et al., 2003).

Die experimentellen Ergebnisse der Ascorbatreduktion deuten darauf hin, dass sich die Spingruppe des SL-Cholesterol zu tief in der Membran befindet, als dass aus dem Reduktionsverlauf Aussagen über die Verteilung des Moleküls zwischen den beiden Membranschichten gewonnen werden könnten. Die Reduktionsgeschwindigkeit ist zu gering, da sich die Spingruppe des SL-Cholesterols an der Fettsäurekette des Moleküls und daher nahe der Membranmitte befindet. Die Zugänglichkeit zum Ascorbat ist dadurch vermindert.

SL-Cholestan und SL-Androstan weisen eine ähnliche Reduzierbarkeit auf, zeigen aber unterschiedliche Spinsondenanteile in den beiden Komponenten, die sich in ihrer Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel unterscheiden (Tabelle 1).

(2) Eine unterschiedliche Struktur des Reduktionsmittels: Das Reduktionsmittel 6-O-Phenylaskorbat ist durch seine veränderte Struktur weniger polar als Askorbat. Dadurch kann es tiefer in die Membran eindringen und effektiver mit den membranassoziierten Doxylgruppen interagieren (Marx et al., 1997).

Die Reduktion der Cholesterolanaloga mit 6-O-Phenylaskorbat ist deutlich schneller als mit Askorbat, was das tiefere Eindringen in die Membran und somit eine verbesserte Interaktion mit den Doxylgruppen aufgrund geringerer Polarität bestätigt. Marx et al. (1997) deuteten ihre Ergebnisse der Reduktion von SL-PC in Ei-PC-Vesikeln bei Raumtemperatur jedoch mit einer Penetration von 6-O-Phenylaskorbat durch die Membran. Diese Vermutung könnte auch bei Diskmembranen zutreffen, da die Veränderungen der Reduktionsverläufe durch den Wechsel des Reduktionsmittels nicht nur die Geschwindigkeit der schnellen Komponente veränderten, sondern den gesamten Reduktionsverlauf. Eine Penetration von 6-O-Phenylaskorbat durch die Erythrozytenmembran wurde auch bei Müller und Herrmann (2002) beschrieben. Diese war jedoch bei 4 °C während der ersten zehn Minuten zu vernachlässigen. Da die Diskmembran im Vergleich zur Erythrozytenmembran einen deutlich höheren Anteil an mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren hat und damit flüidier ist, ist eine schnellere Penetration zu erwarten. Armstrong et al. (2003) fanden bei der Untersuchung der Transmembranbewegung eines Phospholipids in künstlichen PC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäuren eine deutliche Erhöhung der Permeabilität in Membranen mit Docosahexaensäure (DHA, 22:6 ω 3).

Im Widerspruch zur Penetration von 6-O-Phenylaskorbat steht der Reduktionsverlauf von SL-Cholesterol (Abbildung 16). Wenn 6-O-Phenylaskorbat durch die Diskmembran penetrieren kann, sollte diese Spinsonde mindestens genauso schnell reduziert werden wie SL-Cholestan. Der Anteil der Spingruppen der SL-Cholestan-Moleküle, der sich in der inneren Lipidschicht der Membran befindet, liegt weiter von der Membranoberfläche der äußeren Lipidschicht entfernt als die in der Membranmitte befindlichen SL-Cholesterol-Spingruppen (Scheidt et al., 2003). Eine mögliche Interpretation wäre eine lokale Erhöhung der Permeabilität der Membran durch die Cholesterolanaloga SL-Cholestan und SL-Androstan. Sie weisen nicht denselben Kondensationseffekt auf die Lipide der Membran auf wie SL-Cholesterol (Scheidt et al., 2003).

Somit konnten aus diesen Experimenten keine eindeutigen Aussagen über die Verteilung und Beweglichkeit von Cholesterol in Diskmembranen gewonnen werden. Da die Struktur von SL-Cholestan im Vergleich zu SL-Androstan geringere Unterschiede zum nativen Cholesterol aufweist, wurden alle weiteren Untersuchungen mit SL-Cholestan durchgeführt. Aufgrund der vermuteten Penetration von 6-O-Phenylaskorbat durch die Diskmembranen erfolgten die weiteren Reduktionen mit Askorbat.

4.1.2 Beschreibt die langsame Reduktionskomponente die Transmembranbewegung von SL-Cholestan?

Das oben beschriebene Modell von Müller und Herrmann (2002) deutet die langsamere Reduktionskomponente des zweiphasigen Reduktionsverlaufes als Transmembranbewegung des untersuchten Moleküls. In den Kapiteln 3.1.3 bis 3.1.5 wurden die experimentellen Bedingungen der Askorbatreduktion von SL-Cholestan variiert, um die Gültigkeit des Modelles für die Diskmembranen zu überprüfen.

Die temperaturabhängige Askorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen zeigte über einen Temperaturbereich von 4-35 °C konstante Spinsondenanteile in beiden Reduktionskomponenten. Da ca. 30-40 % von SL-C eine geringere Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel zeigten, könnten sie sich in der inneren Lipidschicht befinden. Die Aktivierungsenergien beider Reduktionsprozesse sind mit 29 ± 2 kJ/mol (schnelle) und 33 ± 5 kJ/mol (langsame) etwa gleich groß. Shin und Freed (1989) bestimmten eine Aktivierungsenergie der lateralen Diffusion von SL-C in reinen POPC-Vesikeln von 26 kJ/mol und in POPC-Vesikeln mit 10 mol% Cholesterol von 41 kJ/mol. Die Aktivierungsenergie der Rotationsdiffusion von SL-C wurde von Kusumi und Pasenkiewicz-Gierula (1988) sowohl in DOPC- als auch DPPC-Vesikeln mit 27 kJ/mol bestimmt. Somit befinden sich die Aktivierungsenergien beider Reduktionskomponenten im Bereich einer Lateral- bzw. Rotationsdiffusion. Untersuchungen der Transmembranbewegung von drei verschiedenen Gallensäuren in Ei-PC-Vesikeln (pH 3,5) ergaben Aktivierungsenergien von 20-30 kJ/mol (Cabral et al., 1987). Auch wenn geringe strukturelle Unterschiede zwischen Cholsäure und SL-C bestehen, so zeigt dies doch, dass die ermittelten Aktivierungsenergien der beiden Reduktionskomponenten auch im Bereich einer Transmembranbewegung liegen können.

Falls die langsamere Reduktionskomponente die Transmembranbewegung von SL-C beschreibt, so müsste die Variation der Inkubationszeit der Spinsonde mit den Diskmembranen unterschiedliche Reduktionsverläufe aufzeigen. Bei einer Transmembranbewegung mit einer

Halbwertszeit von 24 Minuten bei 20 °C (Tabelle 4, Seite 55), wären nach vier Minuten Inkubationszeit erst ca. 11 % der zugegebenen Spinsonden in die innere Lipidschicht der Membran gelangt. Nach drei Stunden hätte sich dagegen eine Gleichgewichtsverteilung eingestellt, so dass sich die Spinsondenanteile in den beiden Membranschichten auch bei längerer Inkubationszeit nicht weiter verändern. Die gezeigten Reduktionsverläufe weisen nach vier Minuten bzw. drei Stunden Inkubationszeit den gleichen Spinsondenanteil von etwa 30 % in der langsameren Reduktionskomponente auf. Das kann zwei verschiedene Gründe haben. Zum einen kann es bedeuten, dass sich die gesamten Spinsonden immer noch in der äußeren Membranschicht befinden, also keine Transmembranbewegung stattgefunden hat. Zum anderen, dass sich die Spinsonden bereits nach dieser kurzen Zeit von vier Minuten in einer Gleichgewichtsverteilung befinden. Das ließe auf eine sehr schnelle Transmembranbewegung schließen. Da die Reduktionen von SL-C auch nach sechsstündiger Inkubation den gleichen Verlauf zeigten (Daten nicht dargestellt), würde die erste Interpretation bedeuten, dass die Halbwertszeit der Transmembranbewegung in der Größenordnung von einem Tag läge. Dies scheint physiologisch unwahrscheinlich, da Cholesterol in anderen Membransystemen deutlich schnellere Geschwindigkeiten der Transmembranbewegung zeigt, wie nachfolgend beschrieben wird.

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Untersuchung der Transmembranbewegung von Cholesterol beschrieben. Müller und Herrmann (2002) verwendeten die Reduktion von SL-C und erhielten Halbwertszeiten von ca. 30 Sekunden sowohl in Erythrozyten als auch in Vesikeln aus Erythrozytenlipiden. Es wurden Cyclodextrine verwendet, um Cholesterol aus Erythrozytenmembranen zu extrahieren bzw. den Transfer zwischen verschiedenen künstlichen Membranen zu beschleunigen (Steck et al., 2002; Leventis und Silvius, 2001) womit Halbwertszeiten der Transmembranbewegung von wenigen Sekunden bis zwei Minuten bestimmt wurden. Auch die Verwendung von fluoreszierenden Sterolen wie Dehydroergosterol erbrachte Halbwertszeiten von etwa 30 Sekunden in POPC-Vesikeln (John et al., 2002).

Insofern können zwar keine Aussagen über die Anteile des SL-C in den beiden Diskmembranlipidschichten gemacht werden, jedoch deutet nichts darauf hin, dass sich die Spinsonden ausschließlich in der äußeren Lipidschicht der Diskmembranen befinden. Daher sprechen die Ergebnisse der Variation der Inkubationszeit für eine schnelle Transmembranbewegung von SL-C in Diskmembranen mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten bei 20 °C. Desweiteren deuten die bisherigen Ergebnisse der Ascorbatreduktion von SL-C auf die Existenz von zwei SL-C-Populationen hin, die sich in ihrer Zugänglichkeit zum Reduktionsmittel Ascorbat unterscheiden.

4.1.3 Was beschreibt die langsame Reduktionskomponente?

Durch die Variation der Inkubationszeit von SL-C mit den Diskmembranen konnte gezeigt werden, dass die langsamere Reduktionskomponente nicht die Transmembranbewegung von SL-C in Diskmembranen beschreibt, wie es in dem Modell von Müller und Herrmann für Erythrozyten erläutert wurde. Deshalb stellt sich die Frage, welche Ursache die unterschiedliche Zugänglichkeit der Spinsondenmoleküle hat. Warum werden ca. 30-40 % von SL-C langsamer reduziert, obwohl von einer schnellen Transmembranbewegung der Spinsonde ausgegangen werden kann?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden vergleichende Messungen der Askorbatreduktion von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln durchgeführt (3.1.5). Da die Zugabe der Spinsonde vor der POPC-Vesikelpräparation erfolgte, wurde von einer symmetrischen Verteilung in der Membran ausgegangen. Bei einem Vesikeldurchmesser von ca. 200 nm entspricht dies einer Verteilung von je 50 % der Spinsonden in den beiden Lipidschichten der Membran. Eine vergleichende Messung der Askorbatreduktion der Phospholipidspinsonde SL-PC in POPC-Vesikeln bestätigt diese Annahme. Der Reduktionsverlauf konnte durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden und erreichte ein Plateau von 50 %. Dies entspricht dem Spinsondenanteil in der äußeren Lipidschicht der POPC-Membran. Die Spinsonden in der inneren Lipidschicht waren der Reduktion durch Askorbat nicht zugänglich. Untersuchungen von Buton et al. (2002) unterstützen diese Resultate. Sie konnten mittels Askorbatreduktion von SL-PC in asymmetrisch markierten Ei-PC-Vesikeln (Zugabe der Spinsondenmoleküle nach der Vesikelpräparation) bei 20 °C während der ersten vier Stunden keine Spinsonden in der inneren Lipidschicht der Membran finden. Demzufolge lag die Halbwertszeit der Transmembranbewegung dieser Spinsonde in Größenordnungen von Tagen. Da die Präparation der symmetrisch markierten POPC-Vesikel mit SL-C und SL-PC in gleicher Weise durchgeführt wurden, sollte daher von einer 50 %igen Verteilung von SL-C in beiden Lipidschichten ausgegangen werden.

Die vergleichenden Askorbatreduktionen von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln in Abhängigkeit von drei verschiedenen Temperaturen zeigten jedoch nicht die erwartete symmetrische Verteilung. Da die Reduktionsverläufe in Diskmembranen mit einer schnellen Transmembranbewegung von SL-C erklärt werden können, ist die langsamere Reduktionskomponente scheinbar unabhängig vom Membrantyp. Da aufgrund der Vesikelpräparation von einer symmetrischen Verteilung des SL-C in der POPC-Membran ausgegangen werden kann, sind diese Reduktionsverläufe nur durch zusätzliche Eigenschaften der Cholestanspin-

sonde im Vergleich zum SL-PC zu erklären. Dabei könnte es sich zum Beispiel um eine inhomogene Verteilung des SL-C in der POPC-Membran handeln. Die Wechselwirkung des starren Sterol-Ringes mit den Fettsäureketten wird durch die Doppelbindung der Ölsäure behindert. Für Cholesterol ist bekannt, dass es bevorzugt mit gesättigten Fettsäuren interagiert (Smaby et al., 1997).

Bei höheren Temperaturen (20-30 °C) ist eine deutlich schnellere Reduzierbarkeit von SL-C in Diskmembranen im Vergleich zu POPC zu erkennen, was mit der unterschiedlichen Membranzusammensetzung erklärt werden kann. Die Phospholipide der Diskmembranen haben nicht nur verschiedene Kopfgruppen, sondern auch eine sehr große Variabilität in den Fettsäuren. Der hohe Anteil der DHA kann die höhere Geschwindigkeit der langsamen Komponente in Diskmembranen gegenüber den POPC-Membranen erklären, da die DHA die Mikroviskosität der Membran erniedrigt (Litman und Mitchell, 1996, Armstrong et al., 2003).

Der Vergleich des Ordnungsparameters S und der Rotationskorrelationszeit τ_R von SL-C in beiden Membranen sollte Informationen über die Beweglichkeit der Spinsonde in den verschiedenen Lipidumgebungen bringen. Der Temperaturverlauf des Ordnungsparameters S weist auf eine stärkere Temperaturabhängigkeit der Beweglichkeit von SL-C in der POPC-Membran hin (Abbildung 23). Die Werte liegen mit 0,2 bis 0,5 jedoch für beide Membranen im Bereich geringer Ordnung. In diesem Bereich lässt sich der Ordnungsparameter auch über den Winkel θ zwischen der Membrannormalen und der Längsachse des Moleküls bestimmen (Winter und Noll, 1998):

$$S = \frac{1}{2} \left(3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1 \right) \quad 4-1$$

Somit können die höheren Werte von S für POPC bei Temperaturen unter 15 °C mit einer stärkeren Einschränkung der Taumelbewegung von SL-C erklärt werden. Der Temperaturverlauf der Rotationskorrelationszeiten ist für beide Membranen gleich, wobei diese in Diskmembranen um 0,5 ns langsamer sind. Zusammenfassend ist aber zu erkennen, dass sich die Beweglichkeit von SL-C trotz unterschiedlicher Lipidzusammensetzung der Membranen und der Tatsache, dass Diskmembranen zusätzlich Proteine enthalten, nur sehr wenig unterscheiden. Da der Temperaturverlauf beider Parameter keine starken Änderungen des Anstiegs aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass sich beide Membranen über den gesamten Temperaturbereich von 4-35 °C in der flüssig-kristallinen Phase befinden. Für POPC geben Ceppi et al. (2005) eine Phasenumwandlungstemperatur von -3,4 °C an. Im Falle der Diskmembra-

nen wurden Werte von weniger als 3 °C (Miljanich et al., 1985) bzw. weniger als 0 °C (Lamba et al., 1994) bestimmt.

Eine mögliche Erklärung für die langsamere Reduktionskomponente in Diskmembranen könnte die von Watts et al. (1979) beschriebene Immobilisierung eines Lipidanteils durch Rhodopsin sein. Die verwendeten Spinsonden zeigten Zwei-Komponenten-ESR-Spektren, aus dem für SL-Androstan ein immobilisierter Anteil von 39 % ermittelt wurde. Pontus und Delmelle (1975) fanden ebenfalls mit Hilfe einer Spinsonde, dass etwa 66 % der Diskmembranlipide fluide sind, was einem immobilisierten Anteil von 34 % entspricht. In Diskmembranen fanden Albert et al. (1996), dass 20 % des Cholesterols der Oxidation durch die Cholesteroxidase nicht zugänglich sind und erklärten dies mit einer Wechselwirkung von je einem Cholesterolmolekül mit Rhodopsin. Auch in anderen Membranen wurden Lipidanteile beschrieben, die sich durch eine geringere Zugänglichkeit auszeichnen. So beschreiben Haynes et al. (2000) eine langsame Komponente der Cyclodextrinextraktion von [³H]Cholesterol in isolierten Plasmamembranen von CHO-K1 Zellen (*chinese hamster ovary* K1 Zellen) mit einem Anteil von 16 %.

Gegen eine Immobilisierung eines Spinsondenanteils spricht, dass die gezeigten ESR-Spektren von SL-C in Diskmembranen und POPC-Vesikeln keinen Hinweis auf zwei, in ihrer Beweglichkeit verschiedene, Komponenten enthalten. Dass die langsame Komponente auch in POPC-Vesikeln existiert, spricht gegen eine Interpretation als Cholesterol-Rhodopsin-Wechselwirkung. Eine sondenspezifische Eigenschaft, wie etwa der umgekehrte Einbau einiger SL-C-Moleküle in die Membran (Spinsondengruppe in der Membranmitte und Fettsäurekette zu Lipid-Wasser-Grenzfläche) kann nicht vollständig ausgeschlossen werden (Scheidt et al., 2003) und würde den ähnlichen Reduktionsverlauf in POPC- und Diskmembranen erklären. Es besteht aber die Möglichkeit zweier ähnlicher Reduktionskomponenten mit unterschiedlicher Ursache.

Somit bleibt festzustellen, dass die Bedeutung der langsameren Reduktionskomponente mit den geschilderten Experimenten nicht eindeutig geklärt werden kann. Eine Wechselwirkung zwischen SL-C und Rhodopsin ist aber aufgrund der beschriebenen Literaturdaten nicht ganz auszuschließen. In dem Fall, dass unter physiologische Temperaturen von 37 °C eine Cholesterolpopulation mit Rhodopsin interagiert und diese durch die langsamere Reduktionskomponente abgebildet wird, läge die Halbwertszeit des Austausches mit der umgebenen Lipidphase bei ca. fünf Minuten. Aussagen über die transversale Verteilung von Cholesterol in der Diskmembran können jedoch nicht getroffen werden.

4.2 Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt

Entlang des Stäbchenaußensegmentes existiert ein Cholesterolgradient. Unter anderem war es ein Ziel dieser Arbeit, die nativen Diskmembranen in Abhängigkeit von ihrem Cholesterolgehalt aus den Außensegmenten zu isolieren. Dafür wurde die von Boesze-Battaglia et al. (1989) beschriebene Methode der Digitoninbeladung und anschließenden Dichtezentrifugation verwendet. Sie inkubierten native Diskmembranen mit Digitonin, mit der Absicht Dichteunterschiede zwischen den Diskmembranen hervorzurufen. Da Digitonin 1:1 Komplexe mit Cholesterol bildet (Nishikawa et al., 1984), sollte sich mehr Digitonin in Diskmembranen mit einem höheren Cholesterolgehalt einbauen als in die mit niedrigerem Cholesterolgehalt. Die anschließende Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten führt dann zur Ausbildung einer breiten Membranbande, von der die Diskmembranen in Fraktionen entnommen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es unter keinen Bedingungen gelungen, eine Membranbande nach der Darstellung der oben genannten Arbeit zu erhalten (3.2). Die gewonnene Bande erstreckte sich über einen geringen Saccharosebereich und enthielt in allen Fraktionen Diskmembranen mit dem gleichen Cholesterolgehalt. Die Präparation der Diskmembranen beinhaltet eine Inkubation von 14 Stunden in einer Ficoll-Lösung. Um sicherzustellen, dass während dieser Zeit kein Austausch des Cholesterols zwischen den Diskvesikeln stattfand, wurde diese Inkubation auf zwei Stunden verkürzt, was jedoch keine bessere Auftrennung der Diskvesikel bewirkte.

Demzufolge war es nicht möglich, native Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zu isolieren. Die Ergebnisse der Cholesterolbestimmung der einzelnen Fraktionen deuten auf einen Ausgleich des Cholesterolgehaltes zwischen den Diskvesikeln während der Präparation hin. Auch in Boesze-Battaglia et al. (1989) wurde diese Gleichverteilung des Cholesterols in der Diskmembransuspension beschrieben, jedoch erst nach Inkubationszeiten von mehr als acht Stunden.

Um den Einfluss des Cholesterols auf die visuelle Signaltransduktion zu untersuchen, wurden deshalb Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt aus der Mischpopulation hergestellt. Durch Inkubation der Diskmembranen mit randM β CD (2-3 mM) konnte der Cholesterolgehalt vermindert, und mit Cholesterol-M β CD-Komplexen erhöht werden. So war es möglich den Cholesterolgehalt von 7-32 mol% zu variieren, ohne den Gehalt an Phospholipiden zu verändern (3.3). Denn Untersuchungen von Anderson et al. (2004) haben gezeigt, dass

es bei höheren M β CD-Konzentrationen zu Störungen der Membranintegrität durch zusätzlichen Entzug von Phospholipiden kommen kann.

Nach den Ergebnissen der kalorimetrischen Untersuchungen (3.4) kann davon ausgegangen werden, dass das zusätzlich angebotene Cholesterol bis zu einem Cholesterolgehalt von 26 mol% wie das nativ vorhandene in die Diskmembran eingebaut wurde. Denn sowohl der Verteilungskoeffizient K_X als auch die Transferenthalpie ΔH blieben über einen Cholesterolbereich von 7-26 mol% konstant. In ihrer Arbeit von 2005 beschreiben Tsamaloukas et al. die Veränderung der beiden Parameter mit steigendem Cholesterolgehalt mit zunehmenden Effekten nichtidealer Mischung von Cholesterol und Phospholipiden. Dies ist bei Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt ab 29 mol% zu beobachten. Ob es bei dieser Cholesterolkonzentration zur Bildung von cholesterolreichen Domänen mit gesättigten Phospholipiden kommt, bleibt unbestimmt. Auch die Entstehung von Cholesterolkristallen wäre möglich, da Membranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine geringere Kapazität besitzen, Cholesterol aufzunehmen (Brzustowicz et al., 1999, Brzustowicz et al. 2002). Da sich der Cholesterolgradient entlang des Stäbchenaußensegmentes von etwa 5-24 mol% erstreckt, sind die modifizierten Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von 7-26 mol% ausreichend, um den Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die visuelle Signaltransduktion zu untersuchen.

4.3 Wechselwirkungen zwischen Cholesterol und den Phospholipiden der Diskmembranen

Nachdem Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt hergestellt wurden, folgten Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Cholesterol und den drei häufigsten Phospholipiden der Diskmembran (PC, PE und PS). Dafür wurde die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga (SL-PL) durch BSA untersucht. Die Extrahierbarkeit der SL-PL aus unbehandelten Diskmembranen zeigt die in Hessel et al. (2000) beschriebene symmetrische Verteilung von SL-PE und SL-PC und eine asymmetrische Verteilung von SL-PS, mit Bevorzugung der äußeren Lipidschicht der Membran.

Auf die Extrahierbarkeit von SL-PS hatte der Cholesterolgehalt der Diskmembranen keinen Einfluss. Auch für SL-PE änderte sich die Extrahierbarkeit in einem Cholesterolbereich von 7-16 mol% nicht. In Diskmembranen mit 26 mol% Cholesterol war die Extrahierbarkeit von SL-PE etwa 30 Minuten nach Spinsondeneinbau um 4 % erhöht. Der Kurvenverlauf lässt aber vermuten, dass diese Differenz durch ein verzögertes Erreichen des Plateaus und somit der Gleichgewichtsverteilung erklärt werden kann. Dass die Extrahierbarkeiten von SL-PS voll-

kommen und SL-PE nahezu unbeeinflusst vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen sind, ist ein weiterer Hinweis auf einen korrekten Einbau des zusätzlichen Cholesterols in die Membran.

Ein vollkommen anderes Bild stellt sich für SL-PC dar. Sowohl in Diskmembranen mit vermindertem als auch mit erhöhtem Cholesterolgehalt ist die Extrahierbarkeit der Spinsonde erhöht. Somit rufen zwei gegensätzliche Veränderungen der Membran eine gleichgerichtete Veränderung des Extraktionsverhaltens hervor. Es ist möglich, dass durch den Entzug von Cholesterol die Geschwindigkeit der Transmembranbewegung der Phospholipidspinsonden erhöht wird. Dadurch könnte innerhalb der einminütigen Inkubation der Diskmembranen mit BSA auf Eis eine signifikante Anzahl an Spinsondenmolekülen aus der inneren Lipidschicht in die äußere gelangen und somit zu der um 6 % erhöhten Extrahierbarkeit von SL-PC in Diskmembranen mit nur 7 mol% Cholesterol führen.

Die Extraktionsdifferenzen in Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt steigen linear mit dem Cholesterolgehalt an, d.h. es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an Cholesterol in der Membran und der Anzahl an Spinsondenmolekülen, welche durch das Cholesterol in ihrer Extrahierbarkeit beeinflusst werden. Ein Spinsondenmolekül wird durch etwa 100 zusätzlich eingebaute Cholesterolmoleküle in seiner Extrahierbarkeit beeinflusst. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Einbau von SL-PC in die innere Lipidschicht der Diskmembran durch die zusätzlichen Cholesterolmoleküle behindert wird.

Da sich die spinmarkierten Phospholipidanaloga nur durch ihre Kopfgruppe unterscheiden, sprechen diese Ergebnisse für eine direkte Wechselwirkung von Phosphatidylcholin mit Cholesterol. Diese bevorzugte Wechselwirkung wird auch in anderen Membranen beschrieben (Ohvo-Rekilä et al., 2002 und enthaltene Referenzen). Durch die größere Kopfgruppenfläche des PC-Moleküls gegenüber PE und PS (Petrache et al., 2004) findet eine bessere Abschirmung der hydrophoben Fläche des Cholesterols in der Membran statt (s.g. *umbrella-model*, Huang und Feigenson, 1999). Eine bevorzugte Wechselwirkung von Cholesterol mit PC war auch aufgrund der Fettsäurezusammensetzung der Diskmembranphospholipide zu erwarten. Die Phospholipide PE und PS haben im Vergleich zu PC einen höheren Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA (Stinson et al., 1991) und PC dafür einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren. Der starre Sterol-Ring des Cholesterolmoleküls interagiert bevorzugt mit gesättigten Fettsäuren, so dass eine Wechselwirkung mit PC aufgrund der Fettsäuren wahrscheinlicher ist. Ob sich die kopfgruppenspezifische Wechselwirkung nur in einer höheren Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Cholesterol in unmittelbarer Umgebung zum PC zeigt,

oder es sich um cholesterolreiche Mikrodomänen in der flüssig-geordneten Phase handelt, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen (siehe 4.8 Ausblick).

Eine direkte Wechselwirkung der beiden Moleküle könnte sich in einer veränderten Beweglichkeit der Spinsonde widerspiegeln. Diese Vermutung konnte durch die Analyse der ESR-Spektren von SL-PC in Diskmembranen mit 10 bzw. 26 mol% nicht bestätigt werden. Es ist aber möglich, dass dies in der Position der Doxylgruppe von SL-PC begründet ist. Da die Doxylgruppe an eine sehr kurze Fettsäure gebunden ist, spiegelt sie die Beweglichkeit in der Grenzfläche zur Kopfgruppenregion wider. Eine Spinsonde mit einer Doxylgruppe an einer langkettigen Fettsäure, die sich tiefer in der Membran befindet, würde die Region in der sich der Sterol-Ring befindet besser charakterisieren können. Der Einbau solcher Spinsonden in native Membranen ist jedoch sehr schwierig.

Die Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchungen haben konstante Werte des Verteilungskoeffizienten K_X und der Transferenthalpie ΔH für die Extraktion von Cholesterol aus Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt gezeigt. Das wurde mit einer nahezu idealen Mischung von Cholesterol mit den Phospholipiden interpretiert. Die oben beschriebenen ESR-Messungen deuten auf eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung zwischen Cholesterol und PC hin. Beide Aussagen scheinen im Widerspruch zueinander zu stehen. Es stellt sich die Frage nach der lateralen Verteilung des Cholesterols in der Diskmembran.

Die in Diskmembranen beschriebenen Detergens resistenten Membranen (DRM) (Seno et al., 2001, Nair et al., 2002 u.a.) lassen auf das Vorhandensein von cholesterolreichen Membrandomänen in der flüssig-geordneten Phase schließen. Jedoch können aufgrund der Präparation dieser DRMs keine Aussagen über die Größe solcher Domänen in der nativen Membran gemacht werden. Außerdem sollten sich solche Domänen in der Spektrenform der verwendeten Lipidspinsonden widerspiegeln. ESR-Spektren bestehend aus zwei Komponenten (mobil und immobil) wurden in künstlichen Vesikeln mit Phasenkoexistenz zwischen der flüssig-geordneten und flüssig-ungeordneten Phase beschrieben (Collado et al., 2005). Kein Spektrum der in dieser Arbeit verwendeten Sterol- bzw. Phospholipidspinsonden zeigte solch eine Zwei-Komponentenform. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Anteil der immobilisierten Lipide zu gering ist, um im ESR-Spektrum die Charakteristika einer immobilisierten Spinsondenfraktion zu zeigen. Elliott et al. (2008) bestimmten, dass sich nur etwa 8 % der Diskmembranlipide und etwa 4,8 % der Proteine in den DRMs befinden. Eine präparativ bedingte Zusammenlagerung von Lipiden und Proteinen, welche vorher nahezu homogen in der

nativen Diskmembran verteilt waren, sich aber durch ihre Wechselwirkungen untereinander von den restlichen Membranbestandteilen unterscheiden, ist nicht auszuschließen (Heerklotz et al., 2003).

4.4 Einfluss des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen auf die Aktivierung von Rhodopsin

Der Rezeptor der visuellen Signaltransduktion, Rhodopsin, ist ein integrales Membranprotein bestehend aus sieben Transmembranhelices, die eine Tasche bilden in deren Inneren das Retinal gebunden ist. Die aktive Rezeptorkonformation, die das Transducin binden und aktivieren kann, ist das Meta II, sie steht mit Meta I in einem Gleichgewicht.

Die Bildung von Meta II in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde absorptionspektroskopisch untersucht (3.6.1). Dabei wurde deutlich, dass mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen das Meta I-Meta II-Gleichgewicht auf die Seite des Meta I verschoben wird. Bei pH 7,4 und 20 °C betrug der Meta II-Anteil in unbehandelten Diskmembranen mit einem Cholesterolgehalt von ca. 10 mol% 58 %. Dieser Wert liegt etwas unter dem von Parkes und Liebman (1984) bestimmten Meta II-Anteil von 67 %, was in der unterschiedlichen Präparation der Diskmembranen begründet sein könnte. Eine Erhöhung des Cholesterolgehaltes auf 26 mol% führte zu einer Verringerung des Meta II-Anteils auf 38 %. Ähnliche Ergebnisse wurden von Niu et al. (2001) beschrieben. Die Autoren rekonstituierten Rhodopsin in künstliche Membranen und bestimmten den Meta II-Anteil in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt sowohl mit Phospholipiden mit gesättigten als auch mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren. In Membranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde der Meta II-Anteil bei pH 7,5 und 20 °C durch Zugabe von 30 mol% Cholesterol von 50 % auf 33 % vermindert.

Ebenso wie der Meta II-Anteil erfolgte auch die Bestimmung der Geschwindigkeit der Meta II-Bildung in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. Eine Abhängigkeit der Gesamtgeschwindigkeit (k_{obs} , Tabelle 6) der Meta II-Bildung vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen wurde nicht beobachtet. Die Unterschiede der errechneten Halbwertszeiten sind nicht signifikant. Wie bereits erläutert, ist die Gesamtgeschwindigkeitskonstante k_{obs} die Summe aus den Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Die cholesterolabhängige Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Umwandlung von Meta I zu Meta II (k_1) und umgekehrt (k_2) zeigt einen gegenläufigen Effekt. Das spricht dafür, dass durch eine Verminderung des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen der Übergang von Meta I zu

Meta II begünstigt wird. Mitchell et al. (2001) bestimmten in dem oben beschriebenen rekonstituierten System die Gesamtgeschwindigkeiten der Meta II-Bildung. In Membranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren führte die Erhöhung des Cholesterolgehaltes auf 30 mol% ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung. Anders als in Membranen mit gesättigten Fettsäuren, in denen sich die Geschwindigkeit durch Zugabe von 30 mol% Cholesterol auf die Hälfte verringerte.

Die experimentellen Daten zeigen eine deutliche Abhängigkeit des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen. Da Meta II aufgrund der Konformationsänderung mehr Volumen in der Membran benötigt (Attwood und Gutfreund, 1980), ist dessen Bildung in fluiden Membranen begünstigt. Moleküle, die wie das Cholesterol die Ordnung der Fettsäureketten erhöhen bzw. das freie Volumen im Bereich der Fettsäureketten reduzieren, begünstigen dagegen die Meta I-Form.

4.5 Interaktionen zwischen Cholesterol und Transducin

4.5.1 Einfluss von Transducin auf das Meta I-Meta II-Gleichgewicht

Das Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II kann zusätzlich zum pH-Wert, der Temperatur und der Lipidumgebung auch durch Proteine beeinflusst werden, die bevorzugt an die Meta II-Form des Rezeptors binden. Durch diese Komplexbildung verändert sich das Gleichgewicht zu Gunsten von Meta II (Emeis und Hofmann, 1981, Schleicher et al., 1989). Der Effekt von Transducin auf die Meta II-Bildung in Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde in vorherigen Kapiteln (3.6.2) beschrieben. Dabei besteht eine Abhängigkeit von der Konzentration des Transducins. Je höher die Transducinkonzentration, desto geringer ist die cholesterolbedingte Erniedrigung des Meta II-Anteils.

In den Stäbchenaußensegmenten liegen Rhodopsin und Transducin im Verhältnis 10:1 vor (Pugh und Lamb, 2000). Unter physiologischen Bedingungen des Dämmerungssehens werden ca. 0,001 % des Rhodopsin aktiviert (Mitchell et al., 2001), was einem aktivierten Rhodopsin pro Diskvesikel entspricht, so dass es einen Überschuss an Transducin gegenüber dem aktivierten Rezeptor gibt. In diesem Fall wird das Meta I-Meta II-Gleichgewicht fast vollständig auf die Meta II-Seite verschoben. D.h., der oben beschriebene Effekt des erhöhten Cholesterolgehaltes der Diskmembranen kann durch die Anwesenheit von Transducin kompensiert werden und hat somit keine Auswirkungen auf die Signaltransduktion.

4.5.2 Membranbindung von Transducin

Das G-Protein der visuellen Signaltransduktion, Transducin, ist ein peripheres Membranprotein mit Lipidmodifikationen. Die γ -Untereinheit ist farnesyliert und karboxymethyliert (Fukada et al., 1990) und die α -Untereinheit ist heterogen acyliert (Neubert et al., 1992; Kokame et al., 1992). Die Membranbindung von Transducin hängt von mehreren Faktoren ab, z.B. von der Ionenstärke der Lösung und von der Membran- und Proteinkonzentration. Die Dunkelbindung von Transducin an Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt wurde mit Hilfe der zeitaufgelösten Lichtstreuung und eines Zentrifugationsexperimentes untersucht (3.7). Mit beiden Methoden wurde in unbehandelten Diskmembranen bei einer Membrankonzentration von 3 μM Rhodopsin und 0,6 μM Transducin (20 °C) etwa die Hälfte der Moleküle als membrangebunden bestimmt. Gleiche Werte werden in Heck und Hofmann (2001) genannt.

Mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen zeigte sich eine Zunahme des membrangebundenen Transducin-Anteils. In den Ergebnissen der Lichtstreuungsmessungen ist diese Abhängigkeit sehr stark ausgeprägt und in allen untersuchten Diskmembranpopulationen zu finden. Das Zentrifugationsexperiment zeigt prinzipiell den gleichen Zusammenhang zwischen dem Cholesterolgehalt und der Membranbindung von Transducin, jedoch ist der Effekt weniger ausgeprägt. Es stellt sich nun die Frage, welche Eigenschaften von Transducin die vermehrte Bindung an Membranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt erklären können.

Untersuchungen zur Membranbindung von Transducin an Diskmembranen mit Hilfe von spinmarkierten Phospholipiden ergaben eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung von Transducin mit dem negativ geladenen Phosphatidylserin (Hessel et al., 2003). Nahe der Farnesylgruppe befindet sich eine Gruppe positiv geladener Aminosäuren, welche die Membranbindung von Transducin an negativ geladenes Phosphatidylserin begünstigen (Kosloff et al., 2008). In Diskmembranen hat Phosphatidylserin den höchsten Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA (22:6 ω 3) (Stinson et al., 1991). Die Interaktion von Cholesterol mit dieser flexiblen Fettsäure ist im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren stark vermindert.

Der Einbau von Cholesterol in Membranen in der flüssig-kristallinen Phase erhöht die Ordnung im Bereich der Fettsäuren, was zu einer Einschränkung der Beweglichkeit der Fettsäuren führt (Trouard et al., 1999; Smaby et al., 1997). Es wurde vermutet, dass Proteine mit gesättigten Lipidmodifikationen bevorzugt mit geordneten Membranregionen interagieren, wogegen ungesättigte Lipidmodifikationen diese Affinität vermindern (Liang et al., 2001). Wie bereits erwähnt, ist die α -Untereinheit von Transducin heterogen mit den Fettsäuren

12:0, 14:0, 14:1 und 14:2 acyliert, wobei etwa 60 % der Transducinmoleküle mit den ungesättigten Fettsäuren 14:1 und 14:2 modifiziert sind (Neubert et al., 1992; Kokame et al., 1992). Liang et al. (2001) beschrieben eine verminderte Lokalisation der Kinase Fyn in geordneten, cholesterolreichen Membranregionen von T-Zellen, wenn die gesättigten Lipidmodifikationen durch ungesättigte ersetzt wurden. Escriba et al. (1997) untersuchten den Effekt von Cholesterol auf die Membranbindung der G-Protein α -Untereinheit $G_{\alpha i}$ an Ei-PC-Vesikel. $G_{\alpha i}$ ist mit der gesättigten Fettsäure 14:0 acyliert (Buss et al., 1987). Sie fanden einen zweiphasigen Kurvenverlauf mit einer maximalen Membranbindung bei 9 mol% Cholesterol. Im Vergleich zu Ei-PC-Vesikeln ohne Cholesterol war sie um etwa 30 % erhöht. Ab einem Cholesterolgehalt von ca. 20 mol% zeigte sich dagegen eine deutliche Abnahme der Membranbindung. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es einen optimalen Zustand der Membran bezüglich der Ordnung der Fettsäuren gibt, der eine Membranbindung von peripheren Proteinen mittels Lipidmodifikationen maximiert. Sowohl höhere als auch geringere Ordnung vermindert diese Wechselwirkung.

Die γ -Untereinheit von Transducin ist farnesyliert (Fukada et al., 1990). Ähnlich wie bei den ungesättigten Fettsäuren wurde auch bei Isoprenylmodifikationen vermutet, dass ihre Affinität zu geordneten Membranen nur sehr gering ist. In künstlichen Vesikeln konnte gezeigt werden, dass Peptide mit Isoprenylmodifikationen nur sehr schwach mit Lipiden der flüssig-geordneten (lo) Phase interagieren, im Gegensatz zu gesättigten Fettsäuren (Wang et al., 2000). Jedoch konnten Smart et al. (1995) die geranylgeranylierte $G\beta\gamma$ -Untereinheit aus Fibroblasten in Caveolae lokalisieren und Song et al. (1996) fanden, dass das G-Protein Ras (farnesyliert) mit Caveolin in Caveolae von MDCK-Zellen interagiert. Caveolae sind Membraneinstülpungen reich an Caveolin, Sphingomyelin und Cholesterol und somit Membranregionen in der flüssig-geordneten (lo) Phase (Razani et al., 2002). Es kann also von der Art der Lipidmodifikation nicht ohne weiteres auf eine Präferenz für geordnete oder ungeordnete Membranen geschlossen werden.

Unveröffentlichte Daten¹ zur Temperaturabhängigkeit der Membranbindung von Transducin an Diskmembranen zeigten eine deutliche Abnahme des membrangebundenen Transducin-Anteils mit steigender Temperatur (Abbildung 46). Da der lösliche Anteil der Transducinmoleküle mit dem membrangebundenen in einem Gleichgewicht steht, kann für jede untersuchte Temperatur (für diese Membrankonzentration) eine relative Gleichgewichtskonstante K_{rel} aus deren Verhältnis ermittelt werden. Die van't Hoff-Gleichung (4-2) beschreibt den Zusam-

menhang zwischen der absoluten Temperatur (T) und der Gleichgewichtskonstante (K) (R: universelle Gaskonstante):

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad 4-2$$

Unter der Voraussetzung der Temperaturunabhängigkeit der Enthalpie ΔH und der Entropie ΔS ergibt sich aus der logarithmischen Auftragung der Gleichgewichtskonstanten gegen die inverse Temperatur eine Gerade, aus deren Steigung $\Delta H_{v.H.}$ und aus deren Achsenabschnitt $\Delta S_{v.H.}$ ermittelt werden können (van't Hoff-Auftragung).

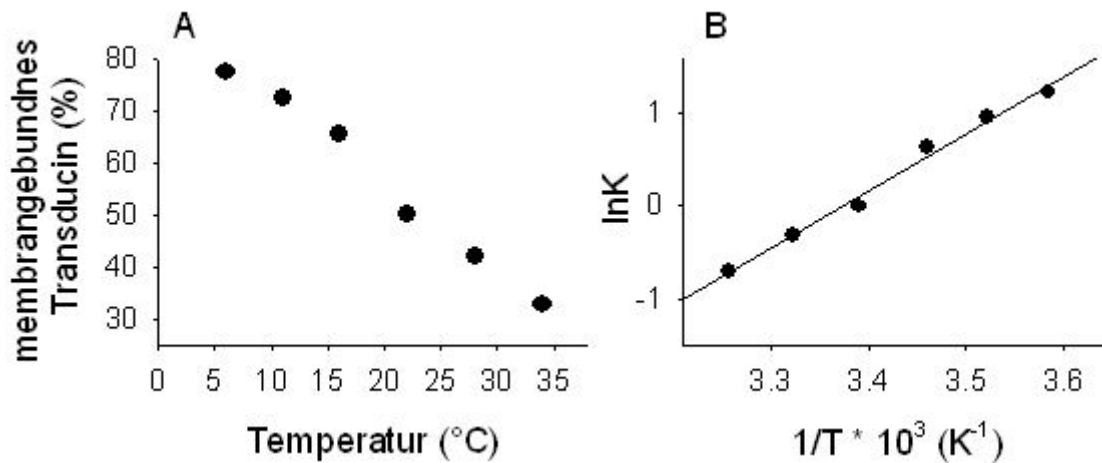


Abbildung 46: Temperaturabhängigkeit der Transducinmembranbindung¹

A: Der membrangebundene Anteil von Transducin an Diskmembranen ist gegen die Temperatur aufgetragen (3 μ M Rhodopsin in Puffer 2, 0,5 μ M Transducin, 3 mM GTP, pH 7,4). **B** Die van't Hoff-Auftragung der in A dargestellten Daten mit dem Ergebnis der linearen Regression.

Die van't Hoff-Auftragung zeigt unter diesen Messbedingungen eine aufsteigende Gerade, woraus sich eine negative Änderung der Enthalpie ergibt. Auch die Änderung der Entropie ist unter diesen Messbedingungen negativ. Das bedeutet, dass die Membranbindung von Transducin enthalpie- und nicht entropiegetrieben ist, wie man es von der Bindung von Lipidankern an die Membran erwartet hätte (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Dieses Ergebnis lässt sich

¹ Die Daten wurden von Dr. Martin Heck erhoben und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

mit der Abschirmung der Transducin-Lipidmodifikation in Lösung erklären, wie sie in Kisselev et al. (1995) beschrieben wurde.

Durch die Erniedrigung der Temperatur erhöht sich die Ordnung in der Membran, d.h. die Beweglichkeit der Fettsäureketten nimmt ab (siehe auch Abbildung 23). Wichtig ist jedoch, dass sich die Diskmembranen im gesamten untersuchten Temperaturbereich in der flüssig-kristallinen Phase befinden. Der Einbau von Cholesterol in eine solche Membran hat ebenfalls eine Zunahme der Ordnung im Bereich der Fettsäureketten zur Folge. Somit ist für die hoch fluiden Diskmembranen der Effekt der sinkenden Temperatur bei konstanter Membranzusammensetzung mit dem Effekt bei steigendem Cholesterolgehalt aber konstanter Temperatur vergleichbar, was die erhöhte Membranbindung von Transducin an Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt bestätigt. Der gleiche Zusammenhang zwischen sinkender Temperatur und steigendem Cholesterolgehalt wurde von Shin und Freed (1989) in PC-Vesikeln beschrieben.

Eine mögliche Ursache dieses Effektes in den Diskmembranen könnte in der hohen Flexibilität der Docosahexaensäure (22:6, DHA) zu finden sein. Diese mehrfach ungesättigte Fettsäure macht etwa die Hälfte der Fettsäuren der Diskmembranen aus (Miljanich et al., 1979, Stinson et al., 1991). Ergebnisse einer Neutronendiffraktionsstudie zeigten eine Präferenz der DHA-Kette für die Lipid-Wasser-Grenzfläche, was für eine gekrümmte, U-förmige Struktur der Fettsäure in der Membran spricht (Mihailescu und Gawrisch, 2006), wobei sich die Konformationen der DHA-Ketten in einem Zeitbereich von Nanosekunden ändern (Soubias und Gawrisch, 2007). Denkbar wäre, dass diese hohe Flexibilität eine stabile Bindung des Lipidankers von Transducin an die Diskmembranen behindert. Erst eine Verminderung dieser Flexibilität durch den Einbau von Cholesterol bzw. die Erniedrigung der Temperatur, was eine gestrecktere Struktur der Fettsäurekette zu Folge hat, optimiert die Membraneigenschaften bezüglich der Wechselwirkung von Lipidanker und Diskmembranlipiden.

Welche der beiden Lipidmodifikationen des Transducins für die Membranbindung des gesamten Proteins verantwortlich ist, ist nicht eindeutig geklärt. Herrmann et al. (2004) fanden keine Membranbindung von Transducin an Diskmembranen wenn auch nur eine der beiden Gruppen fehlte. Das impliziert, dass beide Lipidmodifikationen für eine Membranbindung notwendig sind. Matsuda et al. (1994) dagegen vermuten die Farnesylgruppe der Transducin γ -Untereinheit an der Kontaktstelle zwischen $G\alpha$ und $G\beta\gamma$, da $G\gamma$ -Peptide die Komplexbildung von $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ zu Gt nur verhinderten, wenn diese Peptide farnesyliert waren. Seitz et al. (1999) schlussfolgerten, dass die Lipidmodifikation von $G\alpha$ für die Membranbindung von Gt

verantwortlich ist. Die Ergebnisse von Murray et al. (2001) wiederum deuten auf eine starke Beteiligung der Farnesylgruppe an der Dunkelbindung von Transducin hin. Nahe der Farnesylgruppe befindet sich eine Gruppe positiv geladener Aminosäuren, welche die Membranbindung von Transducin an negativ geladenes Phosphatidylserin begünstigen (Hessel et al., 2003, Kosloff et al., 2008).

4.5.3 Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Transducinaktivierung

Die Aktivierung von Transducin verläuft in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten an der Diskmembran. Nachdem Transducin an einen lichtaktivierten Rezeptor in der Meta II-Form gebunden hat, findet bedingt durch Konformationsänderungen der Austausch von GDP gegen GTP statt. Das aktivierte, GTP-bindende Transducin dissoziiert vom Rezeptor und von der Membran. Diese Dissoziation spiegelt sich im Dissoziationssignal der zeitaufgelösten Lichtstreuung wider. Somit können Aussagen bezüglich der Geschwindigkeit der Transducinaktivierung gewonnen werden.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Transducinaktivierung vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen (3.7). Mit steigendem Cholesterolgehalt kommt es zu einer Abnahme der Geschwindigkeit. Dieser Effekt kann durch den verminderten Meta II-Anteil mit zunehmenden Cholesterolgehalt erklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Transducin auf einen Rezeptor in seiner Meta I-Form trifft, ist in diesem Fall erhöht. Durch diese Rezeptorform kann Transducin jedoch nicht aktiviert werden. Analysiert man die Aktivierung von Transducin im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Transducin als Substrat, das mit Hilfe der Meta II-Form des lichtaktivierten Rezeptors (Enzym) zum aktivierten Transducin umgesetzt wird (Bruckert et al., 1992; Heck und Hofmann, 2001), können kinetische Parameter zur Beschreibung des Aktivierungsprozesses bestimmt werden. Diese gelten aufgrund der Komplexität der Transducinaktivierung nur unter bestimmten Bedingungen. Aus den Ergebnissen von Heck und Hofmann (2001) ist abzuschätzen, dass unter den in dieser Arbeit dargestellten Bedingungen (siehe 3.7) die Transducinkonzentration noch weit unterhalb der Sättigung der Aktivierungsrate liegt. Somit kann der Rezeptor wieder in die Meta I-Form übergehen bevor ein Transducin bindet, und steht dann einer Bindung und Aktivierung von Transducin nicht zur Verfügung, was eine Verlangsamung der Transducinaktivierung zur Folge hat.

Eine weitere mögliche Ursache der verminderten Aktivierungsgeschwindigkeit bei erhöhtem Cholesterolgehalt könnte in der verlangsamten Komplexbildung von Meta II und Transducin zu finden sein. Die Ergebnisse von Mitchell et al. (2001) in künstlichen PC-Vesikeln mit

mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigen jedoch keine Unterschiede in der Geschwindigkeit der Komplexbildung in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt. Dagegen verursacht Cholesterol in PC-Vesikeln mit gesättigten Fettsäuren eine deutliche Verlangsamung. Inwiefern die Komplexbildung einen Anteil an der verlangsamten Aktivierung von Transducin hat, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.6 Interaktionen zwischen Cholesterol und der PDE

4.6.1 Membranbindung der PDE

Ähnlich wie Transducin ist die PDE des Stäbchenaußensegmentes ein peripheres Membranprotein mit Lipidmodifikationen. Die α -Untereinheit ist farnesyliert und karboxymethyliert und die β -Untereinheit geranylgeranyliert (Qin et al., 1992, Anant et al., 1992). In isotomem Puffer ist die Membranbindung abhängig von der Membrankonzentration, d.h. durch Verdünnung der Membransuspension geht ein Teil der membrangebundenen PDE-Moleküle in Lösung. Außerdem benötigt die PDE die beiden Isoprenylgruppen um an die Membran zu binden (Catty et al., 1992). Unter den in den vorherigen Kapiteln (3.8.1) beschriebenen Bedingungen sind etwa die Hälfte der PDE-Moleküle membrangebunden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Anteil vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen abhängt. Der membrangebundene PDE-Anteil nimmt mit steigendem Cholesterolgehalt zu.

Wie bereits für Transducin erläutert, wurde vermutet, dass Isoprenylgruppen eine höhere Affinität zu ungeordneten Membranen aufweisen. Arbeiten zur Untersuchung von Detergens resistenten Membranfraktionen (DRM) in Stäbchenaußensegmenten haben jedoch gezeigt, dass die PDE abhängig vom Aktivierungsschritt in diesen geordneten, cholesterolreichen Membranen nachzuweisen ist (Seno et al., 2001, Liu et al., 2003). Der Entzug von Cholesterol aus diesen Membranen mittels M β CD führte zu einer teilweisen Freisetzung der PDE, was mit einer möglichen Wechselwirkung zwischen der PDE und Cholesterol gedeutet wurde (Seno et al., 2001).

Die experimentellen Daten in den vorherigen Kapiteln zeigten eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung von PC und Cholesterol. Des Weiteren wurde in Hessel et al. (2003) eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung zwischen der PDE und PC gefunden. Beide Ergebnisse zusammen machen eine Interaktion von Cholesterol mit der PDE wahrscheinlich. Dies muss nicht bedeuten, dass die Isoprenylgruppen der PDE direkt mit dem Cholesterol interagieren. Jedoch beeinflusst das zusätzliche Cholesterol in der PC-Umgebung die Membranei-

genschaften dahingehend, das eine stärkere Wechselwirkung zwischen den Isoprenylgruppen und den PC-Molekülen möglich wird, z.B. durch die oben beschriebene Streckung der Fettsäureketten.

4.6.2 Einfluss der PDE auf die Extrahierbarkeit von spinmarkierten Phospholipidanaloga

Mit Hilfe von spinmarkierten Phospholipiden konnten kopfgruppenspezifische Wechselwirkungen zwischen der PDE und den beiden zwitterionischen Phospholipiden PE und PC in Diskmembranen nachgewiesen werden (Hessel et al., 2003). Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ein PDE-Molekül die Extrahierbarkeit von etwa 70 Phospholipiden (PE und PC) verminderte, was mit einer Bindung der PDE an eine Membranfläche bestehend aus diesen Lipiden erklärt wurde.

Die Modifikation des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl der so beeinflussten Phospholipide. Über einen Cholesterolbereich von 7-26 mol% wurden 80-100 PE- und PC-Moleküle pro PDE in ihrer Extrahierbarkeit beeinträchtigt. Dieses Ergebnis stimmt im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit mit dem oben genannten und dem von Malinski und Wensel (1992) berechneten Wert überein. Malinski und Wensel (1992) berechneten die minimale Membranoberfläche, die für die Membranbindung des PDE-G α -Komplexes benötigt wird und erhielten eine Fläche mit 50-250 Phospholipiden.

Dass der Cholesterolgehalt der Diskmembranen keinen Einfluss auf diesen Wert hat, steht im Widerspruch zu den Ergebnissen des Zentrifugationsexperimentes, das eine erhöhte Dunkelbindung der PDE mit steigendem Cholesterolgehalt zeigte (3.8.1). Wenn die verminderte Extrahierbarkeit der SL-PL durch BSA in Anwesenheit von PDE durch eine Bindung der PDE an diese Phospholipide verursacht wird, sollte sich die Erhöhung des membrangebundenen PDE-Anteils in den BSA-Extraktionsexperimenten widerspiegeln. Da beide Experimente jeweils am gleichen Tag mit den gleichen Membran- und Proteinpräparationen durchgeführt wurden, ist diese Diskrepanz unverständlich. Eine mögliche Ursache könnte in der Unterschätzung der Anzahl der beeinflussten PC-Moleküle zu finden sein. Da sich die Extrahierbarkeit von SL-PC ohne PDE in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen erhöhte (siehe 3.5), ist bereits der Bezugswert für die Extrahierbarkeit nach Zugabe der PDE verändert. Dagegen spricht jedoch, dass im Falle von SL-PE die Extrahierbarkeit ohne PDE unabhängig vom Cholesterolgehalt ist, und sich trotzdem keine Unterschiede nach Zugabe der

PDE zeigten. Um die Ursache der Diskrepanz zwischen Zentrifugations- und BSA-Extraktionsexperiment zu finden, sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.6.3 Abhängigkeit der Aktivität der PDE vom Cholesterolgehalt der Diskmembranen

Die Aktivität der PDE hängt im starken Maße von der Anwesenheit von Membranen ab (Bennett und Clerc, 1989, Malinski und Wensel, 1992). Die in den vorherigen Kapiteln (3.8.3) dargestellten Daten bestätigen diesen Effekt. In unbehandelten Diskmembranen wurde eine PDE-Aktivität von ca. 670 cGMP/s·PDE bestimmt. Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur genannten Werten von ca. 600 cGMP/s·PDE bzw. 438 cGMP/s·PDE überein (Heck und Hofmann, 1993, Sitaramayya et al., 1986). Eine Reduktion der Membranmenge um den Faktor 200 führte zu einer Reduktion der PDE-Aktivität auf unter 10 %.

Mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen konnte eine Zunahme der PDE-Aktivität beobachtet werden. Dieser Zusammenhang ist konform mit der Zunahme der Dunkelbindung der PDE mit steigendem Cholesterolgehalt. Unter den genannten experimentellen Bedingungen (5 μ M Rhodopsin, 0,6 μ M Transducin und 50 nM PDE) ist nur ein Teil der PDE-Moleküle membrangebunden und zeigt somit seine volle Aktivität. Der andere Teil ist in Lösung und trägt daher nur unwesentlich zur Gesamtaktivität bei. Nimmt der Anteil membrangebundener PDE aufgrund des erhöhten Cholesterolgehaltes zu, steigt auch die gemessene Aktivität an. In Bruckert et al. (1994) wurde die PDE-Aktivität in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration bestimmt. Es zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der PDE-Aktivität und der Membranmenge bei konstanter Transducinkonzentration. Bei niedrigen Konzentrationen von Membranen wurde erst durch Erhöhung der Transducinkonzentration die maximale PDE-Aktivität erreicht, was mit einer zunehmenden Membranbindung des Komplexes aus aktivierter Transducin α -Untereinheit und der PDE erklärt wurde (Catty et al., 1992).

Diese Abhängigkeit von der Konzentrationen von Membranen bedeutet jedoch, dass unter den nativen Bedingungen im Stäbchenaußensegment mit einer Rhodopsinkonzentration von etwa 3 mM (Liebman, 1962) alle PDE-Moleküle membrangebunden sind, und somit der Einfluss der unterschiedlichen Affinität bezüglich des Cholesterolgehaltes der Diskmembranen auf die Aktivität der PDE vernachlässigt werden kann. Diese Ergebnisse zeigen aber deutlich, dass die PDE-Aktivität in den basalen, cholesterolreichen Diskmembranen des Stäbchenaußen-

segmentes nicht vermindert ist im Vergleich zu den apikalen, cholesterolarmen Diskmembranen, wie von Boesze-Battaglia und Albert (1990) vermutet.

4.7 Physiologische Bedeutung des Cholesterolgradienten entlang des Stäbchenaußensegmentes

Im Folgenden soll die physiologische Bedeutung des erhöhten Cholesterolgehaltes der basalen Diskmembranen für die Signaltransduktion in der intakten Stäbchenzelle diskutiert werden. Dabei werden die in dieser Arbeit erhobenen Daten in einen größeren Zusammenhang gebracht und eine Hypothese zur Bedeutung der Wechselwirkung von Cholesterol mit den untersuchten Proteinen in dem nativen Stäbchenaußensegment der intakten Retina aufgestellt.

Da die Diskmembranen als Ausstülpungen bzw. endozytotische Vesikel der Plasmamembran des Stäbchenaußensegmentes in der Nähe des Ziliums (Steinberg et al., 1980, Chuang et al., 2007) entstehen, haben sie zu Beginn mit 28 mol% einen Cholesterolgehalt ähnlich der Plasmamembran (Boesze-Battaglia und Albert, 1990). In einem Zeitraum von etwa zehn Tagen durchläuft ein Diskvesikel das gesamte Stäbchenaußensegment vom basalen zum apikalen Ende (Young, 1967). Während dieses Prozesses nimmt der Cholesterolgehalt der Diskmembran bis auf 5 mol% ab (Boesze-Battaglia et al., 1989). Aus den bisherigen Untersuchungen bezüglich des Einflusses des Cholesterolgehaltes auf die visuelle Signaltransduktion wurde der Schluss gezogen, dass diese im basalen Teil des Stäbchenaußensegmentes stark beeinträchtigt ist, und erst durch die Abnahme des Cholesterolgehaltes ihre vollständige Funktionsfähigkeit erlangt (Albert und Boesze-Battaglia, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass trotz der deutlich verminderten Bildung der aktiven Rezeptorkonformation Meta II die Signaltransduktion auch in Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt adäquat, wenn auch verlangsamt, stattfindet. D.h. dass vergleichbare Mengen an cGMP von der PDE hydrolysiert werden und somit die basalen Diskmembranen ebenfalls zur Schließung der Kationenkanäle und somit zur Hyperpolarisation der Plasmamembran beitragen können. Durch die höhere Affinität der beiden peripheren Proteine Transducin und PDE zu Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt kann der geringere Anteil des Meta II kompensiert werden. Eine gleichmäßige Stromdichte entlang des Stäbchenaußensegmentes wurde ebenfalls von Baylor et al. (1979) bestimmt. Sie benutzten eine so genannte *suction electrode*, um den Membranstrom eines einzelnen Außensegmentes in Abhängigkeit von der Länge des Außensegmentabschnittes innerhalb der Pipette zu messen und erhielten einen linearen Zusammenhang.

Entlang des Stäbchenaußensegmentes scheint somit ein Ausgleich in den Membraneigenschaften stattzufinden, der eine gleichmäßige Signaltransduktion entlang der gesamten Länge sicherstellt. Der höhere Cholesterolgehalt der basalen Diskmembranen begünstigt die Membranbindung der peripheren Proteine Transducin und PDE, wogegen die Abnahme des Cholesterolgehaltes mit zunehmender Verlagerung der Diskmembranen zum apikalen Ende die Bildung von Meta II begünstigt (u.a. Niu et al., 2001).

Es wurde davon ausgegangen, dass unter den nativen Bedingungen im Stäbchenaußensegment mit einer Rhodopsinkonzentration von etwa 3 mM (Liebman, 1962) alle PDE-Moleküle membrangebunden sind (Catty et al., 1992, Bruckert et al., 1994). Ebenso wurde gefunden, dass sich Transducin in Stäbchenaußensegmenten in isotonem Puffer an der Membran befindet (Kühn, 1980). Somit stellt sich die Frage, welche Bedeutung die in dieser Arbeit gefundene Erhöhung der Membranbindung von Transducin und der PDE mit steigendem Cholesterolgehalt der Diskmembranen für das native Stäbchenaußensegment hat.

Erstens zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die beiden peripheren Proteine an Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt binden, wovon aufgrund der Lipidmodifikationen mit Isoprenylgruppen und ungesättigten Fettsäuren nicht ohne weiteres auszugehen war. Zweitens wurde sogar eine erhöhte Bindung an Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt festgestellt, was wiederum die Besonderheit dieser spezialisierten Membran mit dem ungewöhnlich hohen Anteil an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren verdeutlicht. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass diese erhöhte Affinität nicht auch *in vivo* vorhanden ist. Untersuchungen zur lichtbedingten Translokation von Transducin zwischen dem Außen- und Innensegment, bei denen die Stäbchenaußensegmente von Mäusen in bis zu fünf Abschnitte unterteilt wurde, deuten auf eine homogene Verteilung des G-Proteins entlang des Außensegmentes hin (Sokolov et al., 2002, Solokov et al., 2004).

Die lichtinduzierte Translokation der Transducin-Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ vom Stäbchenaußensegment in das Innensegment wird als diffusionsgetriebener Prozess diskutiert (Calvert et al., 2006). Die Membranaffinität der α -Untereinheit ist deutlich geringer als die des Holo-proteins $G\alpha\beta\gamma$ (Bigay et al., 1994) und die Membranbindung der $\beta\gamma$ -Untereinheit wird durch die Interaktion mit Phosducin vermindert (Lee et al., 1992). Somit kann die Translokation mit der erhöhten Löslichkeit der Untereinheiten nach Rezeptoraktivierung erklärt werden. Die Dunkelverteilung von Transducin im Außensegment wird mit der hohen Membranaffinität von $G\alpha\beta\gamma$ und der hohen Membrandichte im Vergleich zum Innensegment begründet. Auch die Rückkehr von Transducin ins Außensegment könnte so gedeutet werden. Dass die

Untereinheiten mit der gleichen Geschwindigkeit ins Außensegment zurückkehren (Sokolov et al., 2002), spricht für eine Rückkehr als $G\alpha\beta\gamma$. In diesem Fall würde die erhöhte Affinität von Transducin für die basalen Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt die Rückkehr ins Außensegment begünstigen. Einmal im Außensegment angekommen, könnte die Verteilung von Gt entlang des Diskmembranstapels durch die maximale Gt-Menge von 1:4 (Gt:Rhodopsin) pro Diskmembran erfolgen (Baehr et al., 1982, Heck und Hofmann, 2001).

In der Plasmamembran ist die Aktivierung des Rhodopsin nahezu vollständig unterdrückt (Boesze-Battaglia und Albert, 1990). Dies ist durch die spezielle Lipidumgebung bedingt. In der Plasmamembran ist nicht nur der Cholesterolgehalt im Vergleich zu den Diskmembranen deutlich erhöht, sondern sie hat auch eine andere Phospholipidkopfgruppen- und Fettsäurezusammensetzung. So enthält die Plasmamembran nur 5 % der mehrfach ungesättigten Fettsäure DHA, dagegen aber einen höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren, und der Anteil an Phosphatidylethanolamin ist mit nur 11 % deutlich geringer als in Diskmembranen (Boesze-Battaglia und Schimmel, 1997). Letzteres führt ebenfalls zu einer verminderten Bildung von Meta II (Alves et al., 2005). Diese Unterdrückung der Rezeptoraktivierung in der Plasmamembran scheint physiologisch sinnvoll, da ein Teil der Rhodopsinmoleküle in den neuen, basalen Diskvesikeln von der Plasmamembran bereitgestellt wird (Chuang et al., 2007). Der Einbau von Opsin aus der Plasmamembran in die Diskmembranen und eine anschließende Regenerierung mit 11-cis-Retinal wäre energetisch aufwendiger.

Eine genaue Analyse des Cholesterolgradienten, d.h. seiner Verlaufsform entlang des Stäbchenaußensegmentes, würde das Verständnis und die Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit verbessern. Da der Cholesterolgehalt der unbehandelten Diskmembranen (Mischpopulation) ca. 10 mol% beträgt und der Cholesterolbereich des Stäbchenaußensegmentes von 5-24 mol% reicht, lässt dies auf einen nichtlinearen Verlauf schließen. Eigene Berechnungen zeigen, dass nur ca. 20 % aller Diskvesikel im Stäbchenaußensegment einen Cholesterolgehalt von über 15 mol% aufweisen, d.h. der Cholesterolgehalt nimmt im basalen Bereich des Stäbchenaußensegmentes sehr schnell ab.

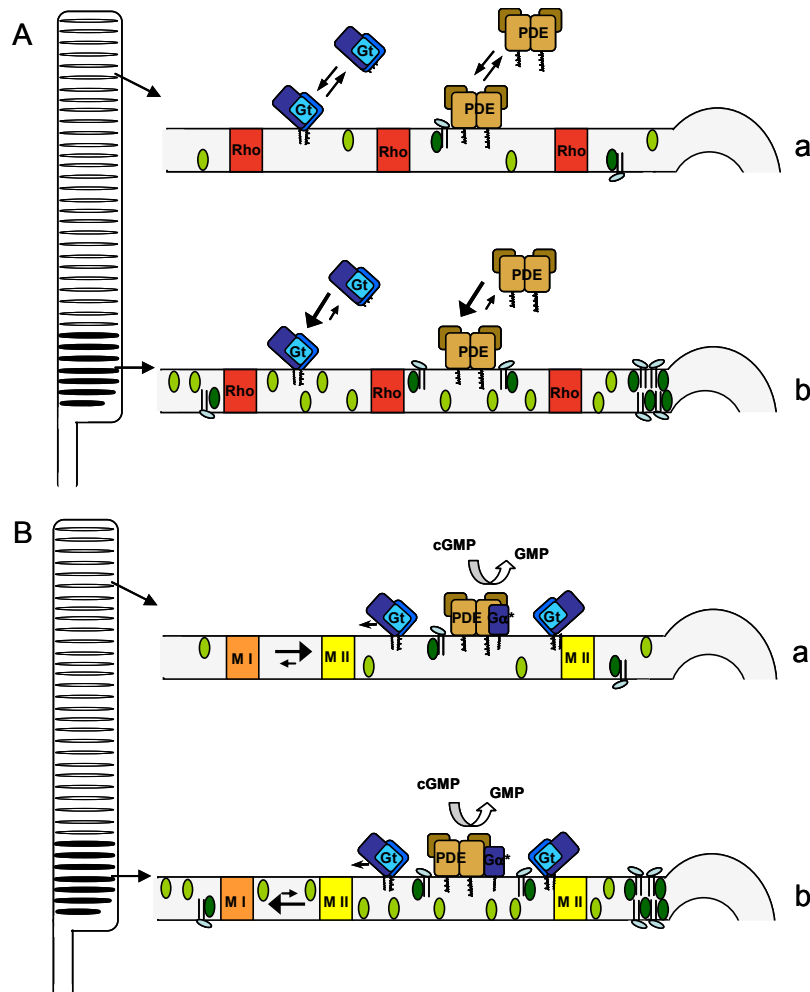
Auf der Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde ein Modell erstellt, das versucht die Rolle des Cholesterols in der visuellen Signaltransduktion widerspruchsfrei zu erklären. Dabei werden die Diskmembranen zum einen im Aktivierungszustand des Rhodopsins und zum anderen nach ihrem Cholesterolgehalt unterschieden (Abbildung 47).

Wie bereits erwähnt, haben nur etwa 20 % der Diskvesikel im Stäbchenaußensegment einen Cholesterolgehalt von über 15 mol%. In der Diskmembran gibt es zwei Cholesterolpopulatio-

nen, die sich in ihrer Zugänglichkeit zum Zytoplasma unterscheiden. Die Mehrzahl der Cholesterolmoleküle (etwa 70 %) weist eine hohe Beweglichkeit in der Diskmembran auf, mit einer Halbwertszeit der Transmembranbewegung von maximal einer Minute bei 37 °C. Die zweite Population (etwa 30 %) zeigt eine verminderte Zugänglichkeit zum Zytoplasma mit einer Halbwertszeit von etwa fünf Minuten.

Eine mögliche Interpretation ist die kopfgruppenspezifische Interaktion von Cholesterol mit Phosphatidylcholin (PC). Dieses Phospholipid kann aufgrund der größeren Kopfgruppe den hydrophoben Teil des Cholesterols besser von der wässrigen Phase abschirmen als die anderen Phospholipide (*umbrella-model*, Huang und Feigenson, 1999). In den Diskmembranen hat PC außerdem den höchsten Anteil gesättigter Fettsäuren, was für eine bevorzugte Interaktion mit dem Cholesterol spricht. Ob diese speziellen Lipid-Lipid-Wechselwirkungen vermehrt in der Randregion der Diskvesikel auftreten, bleibt spekulativ. Ebenso ob es sich um einzelne Moleküle oder kleine Domänen handelt. Die Untersuchung einer Dreikomponenten-Mischung (Sphingomyelin, POPC und Cholesterol) in künstlichen Vesikeln mittels ^2H -NMR zeigte, dass auch bei physiologischen Temperaturen Inhomogenitäten in der lateralen Lipidverteilung existieren. Sie liegen jedoch mit einem Durchmesser von etwa 50 nm unterhalb des Auflösungsvermögens der Fluoreszenzmikroskopie (Bunge et al., 2008). Es wäre also denkbar, dass ein Teil der Lipid-Lipid-Wechselwirkungen in Diskmembranen in kleinen Mikrodomänen nahe der Randregion zu finden sind. Die hohe Rhodopsindichte im lamellaren Teil der Diskvesikel birgt nur sehr vermindert Raum für größeren Lipidkluster (zur Veranschaulichung siehe Abbildung 6).

Es ist nicht ganz auszuschließen, dass es in den basalen Diskmembranen zu Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und Cholesterol kommt. Grossfield et al. (2006) fanden mit Hilfe von Computersimulationen Kontaktstellen (Gruppen von Aminosäuren) am Rhodopsin, mit denen Cholesterol bevorzugt interagiert. Sie befinden sich zum einen in der unmittelbaren Nähe der beiden palmitylierten Cycteine und im Bereich der intradiskalen Hälfte der Helix 3 und 4. Eine Interaktion von Cholesterol mit den beiden Palmitylierungen wurde auch in Pitman et al. (2005) beschrieben. Dabei ist jedoch festzuhalten, dass es sich bei diesen Kontaktstellen nicht um spezifische Bindungsstellen handelt, wie sie etwa für den β_2 -adrenergen Rezeptor gefunden wurden (Hanson et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit können diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Dazu wären weitere Untersuchungen nötig.



● Cholesterin, ● Cholesterin mit verminderter Zugänglichkeit zum Zytoplasma, ▮ Phosphatidylcholin; Die dargestellte Rhodopsindichte entspricht nicht der im Stäbchenaußensegment!

Abbildung 47: Modell zur Rolle des Cholesterols in der visuellen Signaltransduktion

Entlang des Stäbchenaußensegmentes existiert ein Cholesteringradient, mit 24 mol% Cholesterin in den basalen Diskmembranen (b) und 5 mol% in den apikalen (a). Ein Cholesteringehalt über 15 mol% ist durch die dickeren Linien der Diskvesikel dargestellt. Es gibt zwei Cholesterinpopulationen, die sich in ihrer Zugänglichkeit zum Zytoplasma unterscheiden. Diese verminderte Zugänglichkeit von 30 % des Cholesterols kann durch eine kopfgruppenspezifische Wechselwirkung mit Phosphatidylcholin (PC) erklärt werden. Bei höherem Cholesteringehalt könnte es zusätzlich zu Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und Rhodopsin kommen. Wie in der Abbildung angedeutet, könnte es in der Randregion der Diskvesikel zu einer vermehrten Ansammlung von Cholesterin und PC kommen. **A:** Im Dunkelzustand des Stäbchenaußensegmentes ist die Membranbindung der beiden peripheren Proteine Transducin (Gt) und Phosphodiesterase (PDE) in den basalen Diskmembranen höher als in den apikalen. **B:** Nach der Lichtaktivierung des Rhodopsins stellt sich das Meta I-Meta II-Gleichgewicht ein, welches in den basalen Diskmembranen auf die Meta I-Seite (M I) verschoben ist. Durch das Transducin wird es vollständig auf die Meta II-Seite (M II) verschoben. Die aktivierte $G\alpha^*$ aktiviert die PDE, die dadurch cGMP zu GMP hydrolysiert.

Im Dunkelzustand der Diskmembran zeigen die peripheren Proteine Transducin (Gt) und Phosphodiesterase (PDE) eine vermehrte Membranbindung bei erhöhtem Cholesterolgehalt. Dieser Effekt wurde im Sinne einer Optimierung der Membranbindung mittels Isoprenyldifikationen durch den erhöhten Cholesterolgehalt diskutiert.

Nach Belichtung des Rhodopsins zeigt sich eine Verschiebung des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes in den basalen Diskmembranen auf die Seite des Meta I. Durch die Volumenzunahme des Meta II gegenüber dem Meta I begünstigt eine Membran mit höherer Ordnung im Bereich der Fettsäureketten, wie es für die basalen Diskmembranen der Fall ist, Meta I. Der Überschuss an Transducinmolekülen gegenüber den lichtaktivierten Rezeptormolekülen unter skotopischen Lichtbedingungen gleicht diesen Unterschied zwischen basalen und apikalen Diskvesikeln aus, da Transducin das Gleichgewicht vollständig auf die Seite des Meta II verschiebt. Somit findet auch in den basalen Diskvesikeln die Signaltransduktion adäquat statt, wenn auch verlangsamt.

Die Wechselwirkungen zwischen den drei untersuchten Proteinen der visuellen Signaltransduktion und der Diskmembran mit verändertem Cholesterolgehalt zeigen, wie die Lipidumgebung die Funktion integraler und peripherer Membranproteine modulieren kann. Diese Erkenntnisse sind auch auf andere Membransysteme bzw. Zellen übertragbar. Rhodopsin und die gesamte visuelle Signaltransduktion dienen dabei als Modell für andere GPCR-Systeme und verweisen auf die Relevanz der Lipidumgebung, seien es direkte Wechselwirkungen einzelner Moleküle oder Veränderungen der Membraneigenschaften aufgrund veränderter Lipidzusammensetzung. Für den metabotropischen Glutamatrezeptor ist eine sterolreiche Membranumgebung für die Bindung des Glutamats notwendig, wie in Insektenzellen, sowohl mit Ergosterol als auch Cholesterol gezeigt wurde (Eroglu et al., 2003). Ebenso ist die Anwesenheit von Cholesterol für die Bindung des Oxytocins an den myometrialen Oxytocinrezeptor notwendig (Klein und Fahrenholz, 1994). Dabei interagiert Cholesterol direkt mit dem Oxytocinrezeptor (Gimpl et al., 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Besonderheit dieser spezialisierten Membran, mit ihrem ungewöhnlich hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie der DHA, der sonst nur noch in neuronalem Gewebe zu finden ist. Weitere Untersuchungen dieses spezialisierten Membransystems sind notwendig, um die komplexen Wechselwirkungen der Lipide und Proteine untereinander zu verstehen.

4.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sollten zum Verständnis des Einflusses des Cholesterols auf die Proteine der visuellen Signaltransduktion beitragen. Dafür wurde ein nahezu natives Membransystem gewählt. Die verwendeten Diskmembranen entsprechen den nativen Diskvesikeln des intakten Stäbchenaußensegmentes und wurden bezüglich des Cholesterolgehaltes moduliert. Somit konnten die Funktionsmechanismen der untersuchten Proteine in der komplexen Umgebung der nativen Membranen betrachtet werden, was den großen Unterschied zu den bisherigen Untersuchungen in künstlichen Systemen ausmacht. Da es bisher jedoch nicht möglich ist, die nativen Diskmembranen in Abhängigkeit ihres Cholesterolgehaltes zu isolieren, ohne dass es zum Einbau zusätzlicher, nichtnativer Komponenten in die Membran kommt, ist das eine der wichtigen Aufgaben zukünftiger Vorhaben.

Von außerordentlichem Interesse ist auch die Verteilung und Beweglichkeit des Cholesterols in der Membran, sowohl lateral als auch transversal. Hierfür gilt es neue Ansätze für Untersuchungsmethoden zu entwickeln, die es ermöglichen diese Prozesse in einer so besonderen Membran zu beobachten. Dabei liegt die größte Herausforderung in der zeitlichen Auflösung dieser Methoden. Techniken wie *stopped-flow* könnten diese Voraussetzungen erfüllen. Um die laterale Organisation der Diskmembranen zu untersuchen, wäre eine Kombination zweier unterschiedlicher Sondenmoleküle denkbar. So könnten Spin-Spin-Wechselwirkungen von ESR-Sonden spezifische Wechselwirkungen von Lipiden aufdecken. Der Einbau dieser Sonden in eine native Membran stellt jedoch eine nicht zu unterschätzende Einschränkung dar.

Zukünftige Experimente sollten es ermöglichen, einen experimentellen Zusammenhang zwischen der Rezeptoraktivierung und der Interaktion des Rezeptors mit dem Cholesterol herzustellen. Die Anwendung der Ascorbatreduktion von SL-C in belichteten Diskmembranen stellt eine mögliche Methode dar. Nach längerer Belichtungszeit wäre es so auch möglich die Interaktion des Cholesterols mit Opsin zu untersuchen, welches nach dem Zerfall von Meta II entsteht. Diese ligandenfreie Form des Rhodopsins kann die aktive, Transducin-bindene Konformation Ops* annehmen (Scheerer et al., 2008).

Die Untersuchungen der Membranbindung von Transducin ergaben eine höhere Affinität zu Diskmembranen mit erhöhtem Cholesterolgehalt. Diese Versuche wurden bisher nur am Holoprotein durchgeführt. Da die Untereinheiten eine deutlich verschiedene Membranbindung aufweisen, bleibt es Gegenstand zukünftiger Arbeiten, den Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Membranbindung von G α und G $\beta\gamma$ zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Transducin-Membranbindung im intakten Stäbchenaußensegment könnte in der

Verfeinerung der von Sokolov et al. (2002) verwendeten Technik zur Unterteilung des Außensegmentes mit Hilfe von Gefrierschnitten der Retina liegen.

Die Untersuchungen zu den Wechselwirkungen der PDE mit Diskmembranen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zeigten ebenfalls eine erhöhte Membranbindung mit steigendem Cholesterolgehalt und damit verbunden auch eine erhöhte Aktivität. Da die Aktivität der PDE im nativen System die ersten Schritte der Signaltransduktion integriert, wäre es von Interesse, welchen Einfluss die Belichtungsintensität auf die Höhe und Rate der cGMP-Hydrolyse hat. Solche Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, wie sich die Lipidwechselwirkungen der einzelnen Komponenten bei unterschiedlichen Mengen von lichtaktiviertem Rhodopsin auf die letztendliche Signalantwort der Zelle (Hyperpolarisation der Plasmamembran) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt auswirken.

Literaturverzeichnis

- Aittoniemi, J., P. S. Niemela, et al. (2007). "Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine." *Biophys J* 92(4): 1125-37.
- Albert, A. D. and K. Boesze-Battaglia (2005). "The role of cholesterol in rod outer segment membranes." *Prog Lipid Res* 44(2-3): 99-124.
- Albert, A. D., J. E. Young, et al. (1996). "Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes." *Biochim Biophys Acta* 1285(1): 47-55.
- Almeida, P. F., W. L. Vaz, et al. (1992). "Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis." *Biochemistry* 31(29): 6739-47.
- Alves, I. D., G. F. Salgado, et al. (2005). "Phosphatidylethanolamine enhances rhodopsin photoactivation and transducin binding in a solid supported lipid bilayer as determined using plasmon-waveguide resonance spectroscopy." *Biophys J* 88(1): 198-210.
- Anant, J. S., O. C. Ong, et al. (1992). "In vivo differential prenylation of retinal cyclic GMP phosphodiesterase catalytic subunits." *J Biol Chem* 267(2): 687-90.
- Anderson, T. G., A. Tan, et al. (2004). "Calorimetric measurement of phospholipid interaction with methyl-beta-cyclodextrin." *Biochemistry* 43(8): 2251-61.
- Andrews, L. D. and A. I. Cohen (1983). "Freeze-fracture studies of photoreceptor membranes: new observations bearing upon the distribution of cholesterol." *J Cell Biol* 97(3): 749-55.
- Armstrong, V. T., M. R. Brzustowicz, et al. (2003). "Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes." *Arch Biochem Biophys* 414(1): 74-82.
- Arnis, S., K. Fahmy, et al. (1994). "A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin." *J Biol Chem* 269(39): 23879-81.
- Attwood, P. V. and H. Gutfreund (1980). "The application of pressure relaxation to the study of the equilibrium between metarhodopsin I and II from bovine retinas." *FEBS Lett* 119(2): 323-6.

- Baehr, W., M. J. Devlin, et al. (1979). "Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments." *J Biol Chem* 254(22): 11669-77.
- Baehr, W., E. A. Morita, et al. (1982). "Characterization of bovine rod outer segment G-protein." *J Biol Chem* 257(11): 6452-60.
- Bairati, A., Jr. and N. Orzalesi (1963). "The Ultrastructure of the Pigment Epithelium and of the Photoreceptor-Pigment Epithelium Junction in the Human Retina." *J Ultrastruct Res* 41: 484-96.
- Baylor, D. (1996). "How photons start vision." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 560-5.
- Baylor, D. A., T. D. Lamb, et al. (1979). "The membrane current of single rod outer segments." *J Physiol* 288: 589-611.
- Baylor, D. A., T. D. Lamb, et al. (1979b). "Responses of retinal rods to single photons." *J Physiol* 288: 613-34.
- Bennett, N. and A. Clerc (1989). "Activation of cGMP phosphodiesterase in retinal rods: mechanism of interaction with the GTP-binding protein (transducin)." *Biochemistry* 28(18): 7418-24.
- Bigay, J., E. Faurobert, et al. (1994). "Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding." *Biochemistry* 33(47): 14081-90.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-7.
- Boesze-Battaglia, K. and A. D. Albert (1989). "Fatty acid composition of bovine rod outer segment plasma membrane." *Exp Eye Res* 49(4): 699-701.
- Boesze-Battaglia, K. and A. D. Albert (1990). "Cholesterol modulation of photoreceptor function in bovine retinal rod outer segments." *J Biol Chem* 265(34): 20727-30.
- Boesze-Battaglia, K. and A. D. Albert (1992). "Phospholipid distribution among bovine rod outer segment plasma membrane and disk membranes." *Exp Eye Res* 54(5): 821-3.
- Boesze-Battaglia, K. and C. Allen (1998). "Differential rhodopsin regeneration in photoreceptor membranes is correlated with variations in membrane properties." *Biosci Rep* 18(1): 29-38.
- Boesze-Battaglia, K., T. Hennessey, et al. (1989). "Cholesterol heterogeneity in bovine rod outer segment disk membranes." *J Biol Chem* 264(14): 8151-5.

- Boesze-Battaglia, K., O. P. Lamba, et al. (1998). "Fusion between retinal rod outer segment membranes and model membranes: a role for photoreceptor peripherin/rds." *Biochemistry* 37(26): 9477-87.
- Boesze-Battaglia, K. and R. Schimmel (1997). "Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets." *J Exp Biol* 200(Pt 23): 2927-36.
- Böttcher, C. J. F., C. M. van Gent, et al. (1961). "A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination." *Anal. Chim. Acta* 24: 203-204.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bruckert, F., P. Catty, et al. (1994). "Activation of phosphodiesterase by transducin in bovine rod outer segments: characteristics of the successive binding of two transducins." *Biochemistry* 33(42): 12625-34.
- Bruckert, F., M. Chabre, et al. (1992). "Kinetic analysis of the activation of transducin by photoexcited rhodopsin. Influence of the lateral diffusion of transducin and competition of guanosine diphosphate and guanosine triphosphate for the nucleotide site." *Biophys J* 63(3): 616-29.
- Brzustowicz, M. R., V. Cherezov, et al. (2002). "Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation." *Biophys J* 82(1 Pt 1): 285-98.
- Brzustowicz, M. R., W. Stillwell, et al. (1999). "Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated phospholipid membranes: a solid state ^2H NMR investigation." *FEBS Lett* 451(2): 197-202.
- Bunge, A., P. Muller, et al. (2008). "Characterization of the ternary mixture of sphingomyelin, POPC, and cholesterol: support for an inhomogeneous lipid distribution at high temperatures." *Biophys J* 94(7): 2680-90.
- Burns, M. E. and V. Y. Arshavsky (2005). "Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction." *Neuron* 48(3): 387-401.
- Buss, J. E., S. M. Mumby, et al. (1987). "Myristoylated alpha subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7493-7.

- Buton, X., P. Herve, et al. (2002). "Transbilayer movement of monohexosylsphingolipids in endoplasmic reticulum and Golgi membranes." *Biochemistry* 41(43): 13106-15.
- Cabral, D. J., D. M. Small, et al. (1987). "Transbilayer movement of bile acids in model membranes." *Biochemistry* 26(7): 1801-4.
- Caldwell, R. B. and B. J. McLaughlin (1985). "Freeze-fracture study of filipin binding in photoreceptor outer segments and pigment epithelium of dystrophic and normal retinas." *J Comp Neurol* 236(4): 523-37.
- Calvert, P. D., V. I. Govardovskii, et al. (2001). "Membrane protein diffusion sets the speed of rod phototransduction." *Nature* 411(6833): 90-4.
- Calvert, P. D., K. J. Strissel, et al. (2006). "Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors." *Trends Cell Biol* 16(11): 560-8.
- Calvez, J. Y., A. Zachowski, et al. (1988). "Asymmetric distribution of phospholipids in spectrin-poor erythrocyte vesicles." *Biochemistry* 27(15): 5666-70.
- Cassera, M. B., A. M. Silber, et al. (2002). "Differential effects of cholesterol on acyl chain order in erythrocyte membranes as a function of depth from the surface. An electron paramagnetic resonance (EPR) spin label study." *Biophys Chem* 99(2): 117-27.
- Catty, P., C. Pfister, et al. (1992). "The cGMP phosphodiesterase-transducin complex of retinal rods. Membrane binding and subunits interactions." *J Biol Chem* 267(27): 19489-93.
- Ceppi, P., S. Colombo, et al. (2005). "Two tail-anchored protein variants, differing in transmembrane domain length and intracellular sorting, interact differently with lipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45): 16269-74.
- Chuang, J. Z., Y. Zhao, et al. (2007). "SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods." *Cell* 130(3): 535-47.
- Clerc, A. and N. Bennett (1992). "Activated cGMP phosphodiesterase of retinal rods. A complex with transducin alpha subunit." *J Biol Chem* 267(10): 6620-7.
- Collado, M. I., F. M. Goni, et al. (2005). "Domain formation in sphingomyelin/cholesterol mixed membranes studied by spin-label electron spin resonance spectroscopy." *Biochemistry* 44(12): 4911-8.

- Corless, J. M., R. D. Fetter, et al. (1987). "Structural features of the terminal loop region of frog retinal rod outer segment disk membranes: I. Organization of lipid components." *J Comp Neurol* 257(1): 1-8.
- Daemen, F. J. (1973). "Vertebrate rod outer segment membranes." *Biochim Biophys Acta* 300(3): 255-88.
- Deterre, P., J. Bigay, et al. (1988). "cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8): 2424-8.
- Edrington, T. C. t., M. Bennett, et al. (2008). "Calorimetric studies of bovine rod outer segment disk membranes support a monomeric unit for both rhodopsin and opsin." *Biophys J* 95(6): 2859-66.
- Elliott, M. H., Z. A. Nash, et al. (2008). "Differential distribution of proteins and lipids in detergent-resistant and detergent-soluble domains in rod outer segment plasma membranes and disks." *J Neurochem* 104(2): 336-52.
- Emeis, D. and K. P. Hofmann (1981). "Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10% rhodopsin bleaching in bovine disc membranes." *FEBS Lett* 136(2): 201-7.
- Ernst, O. P. and F. J. Bartl (2002). "Active states of rhodopsin." *Chembiochem* 3(10): 968-74.
- Ernst, O. P., V. Gramse, et al. (2007). "Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26): 10859-64.
- Eroglu, C., B. Brugger, et al. (2003). "Glutamate-binding affinity of Drosophila metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10219-24.
- Escriba, P. V., A. Ozaita, et al. (1997). "Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11375-80.
- Eysel, U. (2007). "[Signal reception and processing by the retina]." *Ophthalmologe* 104(1): 79-90; quiz 91.
- Fesenko, E. E., S. S. Kolesnikov, et al. (1985). "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment." *Nature* 313(6000): 310-3.

- Fritze, O., S. Filipek, et al. (2003). "Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*(5): 2290-5.
- Fukada, Y., T. Takao, et al. (1990). "Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding." *Nature* *346*(6285): 658-60.
- Gibson, N. J. and M. F. Brown (1993). "Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes." *Biochemistry* *32*(9): 2438-54.
- Gimpl, G., K. Burger, et al. (1997). "Cholesterol as modulator of receptor function." *Biochemistry* *36*(36): 10959-74.
- Grant, J. E., L. W. Guo, et al. (2006). "The N terminus of GTP gamma S-activated transducin alpha-subunit interacts with the C terminus of the cGMP phosphodiesterase gamma-subunit." *J Biol Chem* *281*(10): 6194-202.
- Grossfield, A., S. E. Feller, et al. (2006). "A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*(13): 4888-93.
- Hanson, M. A., V. Cherezov, et al. (2008). "A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor." *Structure* *16*(6): 897-905.
- Haynes, M. P., M. C. Phillips, et al. (2000). "Efflux of cholesterol from different cellular pools." *Biochemistry* *39*(15): 4508-17.
- Heck, M. and K. P. Hofmann (1993). "G-protein-effector coupling: a real-time light-scattering assay for transducin-phosphodiesterase interaction." *Biochemistry* *32*(32): 8220-7.
- Heck, M. and K. P. Hofmann (2001). "Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism." *J Biol Chem* *276*(13): 10000-9.
- Heck, M., A. Pulvermüller, et al. (2000). "Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins." *Methods Enzymol* *315*: 329-47.
- Heerklotz, H., H. Szadkowska, et al. (2003). "The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton." *J Mol Biol* *329*(4): 793-9.

- Herrmann, R., M. Heck, et al. (2004). "Sequence of interactions in receptor-G protein coupling." *J Biol Chem* 279(23): 24283-90.
- Hessel, E., M. Heck, et al. (2003). "Signal transduction in the visual cascade involves specific lipid-protein interactions." *J Biol Chem* 278(25): 22853-60.
- Hessel, E., A. Herrmann, et al. (2000). "The transbilayer distribution of phospholipids in disc membranes is a dynamic equilibrium evidence for rapid flip and flop movement." *Eur J Biochem* 267(5): 1473-83.
- Holte, L. L., S. A. Peter, et al. (1995). "²H nuclear magnetic resonance order parameter profiles suggest a change of molecular shape for phosphatidylcholines containing a polyunsaturated acyl chain." *Biophys J* 68(6): 2396-403.
- Hu, G. and T. G. Wensel (2002). "R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 9755-60.
- Huang, J. and G. W. Feigenson (1999). "A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers." *Biophys J* 76(4): 2142-57.
- Hubbard, R. and G. Wald (1952). "Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system." *J Gen Physiol* 36(2): 269-315.
- Illing, M., L. L. Molday, et al. (1997). "The 220-kDa rim protein of retinal rod outer segments is a member of the ABC transporter superfamily." *J Biol Chem* 272(15): 10303-10.
- Jacobson, K., O. G. Mouritsen, et al. (2007). "Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics." *Nat Cell Biol* 9(1): 7-14.
- John, K., J. Kubelt, et al. (2002). "Rapid transbilayer movement of the fluorescent sterol dehydroergosterol in lipid membranes." *Biophys J* 83(3): 1525-34.
- Kajimura, N., M. Yamazaki, et al. (2002). "Three-dimensional structure of non-activated cGMP phosphodiesterase 6 and comparison of its image with those of activated forms." *J Struct Biol* 139(1): 27-38.
- Kisselev, O., A. Pronin, et al. (1995). "Receptor-G protein coupling is established by a potential conformational switch in the beta gamma complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9102-6.
- Klein, U. and F. Fahrenholz (1994). "Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol." *Eur J Biochem* 220(2): 559-67.

- Knierim, B., K. P. Hofmann, et al. (2007). "Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51): 20290-5.
- Kokame, K., Y. Fukada, et al. (1992). "Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit." *Nature* 359(6397): 749-52.
- Kosloff, M., E. Alexov, et al. (2008). "Electrostatic and lipid-anchor contributions to the interaction of transducin with membranes: Mechanistic implications for activation and translocation." *J Biol Chem*.
- Kuhn, H. (1980). "Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes." *Nature* 283(5747): 587-9.
- Kusumi, A. and M. Pasenkiewicz-Gierula (1988). "Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine membranes: effects of alkyl chain length, unsaturation, and cholesterol as studied by a spin-label method." *Biochemistry* 27(12): 4407-15.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ." *Nature* Bd. 227: 680-685.
- Lamba, O. P., D. Borchman, et al. (1994). "Fourier transform infrared study of the rod outer segment disk and plasma membranes of vertebrate retina." *Biochemistry* 33(7): 1704-12.
- Lambright, D. G., J. Sondek, et al. (1996). "The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein." *Nature* 379(6563): 311-9.
- Lee, R. H., T. D. Ting, et al. (1992). "Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin." *J Biol Chem* 267(35): 25104-12.
- Leventis, R. and J. R. Silvius (2001). "Use of cyclodextrins to monitor transbilayer movement and differential lipid affinities of cholesterol." *Biophys J* 81(4): 2257-67.
- Li, J., P. C. Edwards, et al. (2004). "Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form." *J Mol Biol* 343(5): 1409-38.
- Liang, X., A. Nazarian, et al. (2001). "Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction." *J Biol Chem* 276(33): 30987-94.
- Liang, Y., D. Fotiadis, et al. (2003). "Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes." *J Biol Chem* 278(24): 21655-62.

- Liebman, P. A. (1962). "In situ microspectrophotometric studies on the pigments of single retinal rods." *Biophys J* 2: 161-78.
- Lipkin, V. M., N. V. Khramtsov, et al. (1990). "Beta-subunit of bovine rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase. Comparison with the phosphodiesterase family." *J Biol Chem* 265(22): 12955-9.
- Litman, B. J. and D. C. Mitchell (1996). "A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function." *Lipids* 31 Suppl: S193-7.
- Liu, H., K. Seno, et al. (2003). "Active transducin alpha subunit carries PDE6 to detergent-resistant membranes in rod photoreceptor outer segments." *Biochem Biophys Res Commun* 303(1): 19-23.
- London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." *Biochim Biophys Acta* 1508(1-2): 182-95.
- Lu, Z. L., J. W. Saldanha, et al. (2002). "Seven-transmembrane receptors: crystals clarify." *Trends Pharmacol Sci* 23(3): 140-6.
- Malinski, J. A. and T. G. Wensel (1992). "Membrane stimulation of cGMP phosphodiesterase activation by transducin: comparison of phospholipid bilayers to rod outer segment membranes." *Biochemistry* 31(39): 9502-12.
- Marx, U., G. Lassmann, et al. (1997). "Rapid kinetics of insertion and accessibility of spin-labeled phospholipid analogs in lipid membranes: a stopped-flow electron paramagnetic resonance approach." *Biophys J* 73(3): 1645-54.
- Matsuda, T., T. Takao, et al. (1994). "Characterization of interactions between transducin alpha/beta gamma-subunits and lipid membranes." *J Biol Chem* 269(48): 30358-63.
- McMullen, T. P., R. N. Lewis, et al. (1993). "Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines." *Biochemistry* 32(2): 516-22.
- Mendez, A., M. E. Burns, et al. (2000). "Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites." *Neuron* 28(1): 153-64.
- Mihailescu, M. and K. Gawrisch (2006). "The structure of polyunsaturated lipid bilayers important for rhodopsin function: a neutron diffraction study." *Biophys J* 90(1): L04-6.

- Miljanich, G. P., M. F. Brown, et al. (1985). "Thermotropic behavior of retinal rod membranes and dispersions of extracted phospholipids." *J Membr Biol* 85(1): 79-86.
- Miljanich, G. P., L. A. Sklar, et al. (1979). "Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane." *Biochim Biophys Acta* 552(2): 294-306.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding." *J Biol Chem* 276(46): 42801-6.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2003). "Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids." *Lipids* 38(4): 437-43.
- Muller, P. and A. Herrmann (2002). "Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes." *Biophys J* 82(3): 1418-28.
- Munro, S. (2003). "Lipid rafts: elusive or illusive?" *Cell* 115(4): 377-88.
- Murray, D., S. McLaughlin, et al. (2001). "The role of electrostatic interactions in the regulation of the membrane association of G protein beta gamma heterodimers." *J Biol Chem* 276(48): 45153-9.
- Nair, K. S., N. Balasubramanian, et al. (2002). "Signal-dependent translocation of transducin, RGS9-1-Gbeta5L complex, and arrestin to detergent-resistant membrane rafts in photoreceptors." *Curr Biol* 12(5): 421-5.
- Neubert, T. A., R. S. Johnson, et al. (1992). "The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated." *J Biol Chem* 267(26): 18274-7.
- Nickell, S., P. S. Park, et al. (2007). "Three-dimensional architecture of murine rod outer segments determined by cryoelectron tomography." *J Cell Biol* 177(5): 917-25.
- Nishijo, J., S. Moriyama, et al. (2003). "Interactions of cholesterol with cyclodextrins in aqueous solution." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51(11): 1253-7.
- Nishikawa, M., S. Nojima, et al. (1984). "Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol." *J Biochem* 96(4): 1231-9.
- Niu, S. L. and B. J. Litman (2002). "Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition." *Biophys J* 83(6): 3408-15.

- Niu, S. L., D. C. Mitchell, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bi-layer lipid composition II: formation of metarhodopsin II-transducin complex." *J Biol Chem* 276(46): 42807-11.
- Niu, S. L., D. C. Mitchell, et al. (2005). "Trans fatty acid derived phospholipids show increased membrane cholesterol and reduced receptor activation as compared to their cis analogs." *Biochemistry* 44(11): 4458-65.
- Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, et al. (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." *Prog Lipid Res* 41(1): 66-97.
- Okada, T., Y. Fujiyoshi, et al. (2002). "Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 5982-7.
- Okada, T., M. Sugihara, et al. (2004). "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure." *J Mol Biol* 342(2): 571-83.
- Palczewski, K. (2006). "G protein-coupled receptor rhodopsin." *Annu Rev Biochem* 75: 743-67.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* 289(5480): 739-45.
- Palczewski, K., J. H. McDowell, et al. (1989). "Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin." *J Biol Chem* 264(27): 15770-3.
- Papermaster, D. S. (1982). "Preparation of retinal rod outer segments." *Methods Enzymol* 81: 48-52.
- Papermaster, D. S. and W. J. Dreyer (1974). "Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods." *Biochemistry* 13(11): 2438-44.
- Park, J. H., P. Scheerer, et al. (2008). "Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin." *Nature* 454(7201): 183-7.
- Parkes, J. H. and P. A. Liebman (1984). "Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions." *Biochemistry* 23(21): 5054-61.
- Patel, A. B., E. Crocker, et al. (2004). "Coupling of retinal isomerization to the activation of rhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27): 10048-53.

- Peitzsch, R. M. and S. McLaughlin (1993). "Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins." *Biochemistry* 32(39): 10436-43.
- Petrache, H. I., S. Tristram-Nagle, et al. (2004). "Structure and fluctuations of charged phosphatidylserine bilayers in the absence of salt." *Biophys J* 86(3): 1574-86.
- Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." *J Lipid Res* 47(7): 1597-8.
- Pitman, M. C., A. Grossfield, et al. (2005). "Role of cholesterol and polyunsaturated chains in lipid-protein interactions: molecular dynamics simulation of rhodopsin in a realistic membrane environment." *J Am Chem Soc* 127(13): 4576-7.
- Polozova, A. and B. J. Litman (2000). "Cholesterol dependent recruitment of di22:6-PC by a G protein-coupled receptor into lateral domains." *Biophys J* 79(5): 2632-43.
- Pontus, M. and M. Delmelle (1975). "Fluid lipid fraction in rod outer segment membrane." *Biochim Biophys Acta* 401(2): 221-30.
- Pugh, E. N., Jr. and T. D. Lamb (1990). "Cyclic GMP and calcium: the internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors." *Vision Res* 30(12): 1923-48.
- Pugh, E. N. J. and T. Lamb (2000). Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanism of amplification, recovery and light adaptation. *Molecular Mechanism in visual transduction*. D. G. Stavenga, W. J. DeGrip and E. N. J. Pugh. Amsterdam, Elsevier science Publisher BV. 3: 183-255.
- Qin, N., S. J. Pittler, et al. (1992). "In vitro isoprenylation and membrane association of mouse rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha and beta subunits expressed in bacteria." *J Biol Chem* 267(12): 8458-63.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." *Pharmacol Rev* 54(3): 431-67.
- Ribeiro, A. and E. A. Dennis (1973). "Effect of thermotropic phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine on the formation of mixed micelles with triton X-100." *Biochim. Biophys. Acta* 332: 26-35.
- Scheerer, P., J. H. Park, et al. (2008). "Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation." *Nature* 455(7212): 497-502.

- Scheidt, H. A., P. Muller, et al. (2003). "The potential of fluorescent and spin-labeled steroid analogs to mimic natural cholesterol." *J Biol Chem* 278(46): 45563-9.
- Schleicher, A. and K. P. Hofmann (1985). "Proton uptake by light induced interaction between rhodopsin and G-protein." *Z Naturforsch [C]* 40(5-6): 400-5.
- Schleicher, A., H. Kühn, et al. (1989). "Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II." *Biochemistry* 28(4): 1770-5.
- Seitz, H. R., M. Heck, et al. (1999). "Molecular determinants of the reversible membrane anchorage of the G-protein transducin." *Biochemistry* 38(25): 7950-60.
- Seno, K., M. Kishimoto, et al. (2001). "Light- and guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate-sensitive localization of a G protein and its effector on detergent-resistant membrane rafts in rod photoreceptor outer segments." *J Biol Chem* 276(24): 20813-6.
- Shichida, Y. and H. Imai (1998). "Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals." *Cell Mol Life Sci* 54(12): 1299-315.
- Shin, Y. K. and J. H. Freed (1989). "Dynamic imaging of lateral diffusion by electron spin resonance and study of rotational dynamics in model membranes. Effect of cholesterol." *Biophys J* 55(3): 537-50.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633): 569-72.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science* 175(23): 720-31.
- Sitaramayya, A., J. Harkness, et al. (1986). "Kinetic studies suggest that light-activated cyclic GMP phosphodiesterase is a complex with G-protein subunits." *Biochemistry* 25(3): 651-6.
- Slep, K. C., M. A. Kercher, et al. (2001). "Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 Å." *Nature* 409(6823): 1071-7.
- Smaby, J. M., M. M. Momsen, et al. (1997). "Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol." *Biophys J* 73(3): 1492-505.
- Smart, E. J., Y. S. Ying, et al. (1995). "A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10104-8.

- Smith, H. G., Jr., G. W. Stubbs, et al. (1975). "The isolation and purification of osmotically intact discs from retinal rod outer segments." *Exp Eye Res* 20(3): 211-7.
- Sokolov, M., A. L. Lyubarsky, et al. (2002). "Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation." *Neuron* 34(1): 95-106.
- Sokolov, M., K. J. Strissel, et al. (2004). "Phosducin facilitates light-driven transducin translocation in rod photoreceptors. Evidence from the phosducin knockout mouse." *J Biol Chem* 279(18): 19149-56.
- Song, K. S., S. Li, et al. (1996). "Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains." *J Biol Chem* 271(16): 9690-7.
- Soubias, O. and K. Gawrisch (2007). "Docosahexaenoyl chains isomerize on the sub-nanosecond time scale." *J Am Chem Soc* 129(21): 6678-9.
- Steck, T. L., J. Ye, et al. (2002). "Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin." *Biophys J* 83(4): 2118-25.
- Steinberg, R. H., S. K. Fisher, et al. (1980). "Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors." *J Comp Neurol* 190(3): 501-8.
- Stillwell, W., S. R. Shaikh, et al. (2005). "Docosahexaenoic acid affects cell signaling by altering lipid rafts." *Reprod Nutr Dev* 45(5): 559-79.
- Stinson, A. M., R. D. Wiegand, et al. (1991). "Fatty acid and molecular species compositions of phospholipids and diacylglycerols from rat retinal membranes." *Exp Eye Res* 52(2): 213-8.
- Szejtli, J. (1998). "Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry." *Chem Rev* 98(5): 1743-1754.
- Tanford, C. (1973). "The hydrophobic Effect: Formation of micelles and biological membranes." John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto
- Teller, D. C., T. Okada, et al. (2001). "Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs)." *Biochemistry* 40(26): 7761-72.

- Trouard, T. P., A. A. Nevzorov, et al. (1999). "Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation." *J Chem Phys* 110(17): 8802-18.
- Tsamaloukas, A., H. Szadkowska, et al. (2005). "Interactions of cholesterol with lipid membranes and cyclodextrin characterized by calorimetry." *Biophys J* 89(2): 1109-19.
- Vishnivetskiy, S. A., C. Schubert, et al. (2000). "An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation." *J Biol Chem* 275(52): 41049-57.
- Wald, G. and P. K. Brown (1953). "The molar extinction of rhodopsin." *J Gen Physiol* 37(2): 189-200.
- Wang, T. Y., R. Leventis, et al. (2000). "Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts"." *Biophys J* 79(2): 919-33.
- Watts, A., I. D. Volotovskii, et al. (1979). "Rhodopsin-lipid associations in bovine rod outer segment membranes. Identification of immobilized lipid by spin-labels." *Biochemistry* 18(22): 5006-13.
- Whorton, M. R., B. Jastrzebska, et al. (2008). "Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer." *J Biol Chem* 283(7): 4387-94.
- Winter, W. and F. Noll (1998). "Methoden der Biophysikalischen Chemie." Teubner Studienbücher Chemie.
- Wong, P. T., S. E. Capes, et al. (1989). "Hydrogen bonding between anhydrous cholesterol and phosphatidylcholines: an infrared spectroscopic study." *Biochim Biophys Acta* 980(1): 37-41.
- Wu, G. and W. L. Hubbell (1993). "Phospholipid asymmetry and transmembrane diffusion in photoreceptor disc membranes." *Biochemistry* 32(3): 879-88.
- Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." *Biochim Biophys Acta* 822(3-4): 267-87.
- Yee, R. and P. A. Liebman (1978). "Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment. Kinetics and parameters of activation and deactivation." *J Biol Chem* 253(24): 8902-9.

- Young, R. W. (1967). "The renewal of photoreceptor cell outer segments." *J Cell Biol* 33(1): 61-72.
- Zerouga, M., L. J. Jenski, et al. (1995). "Comparison of phosphatidylcholines containing one or two docosahexaenoic acyl chains on properties of phospholipid monolayers and bilayers." *Biochim Biophys Acta* 1236(2): 266-72.

Publikationen

Vorträge

„The role of cholesterol in the visual signal transduction“ Gastvortrag im Rahmen eines Arbeitsbesuches an der Universität Basel, Departement Biozentrum: Biophysikalische Chemie, 19.09.2006

Poster

Katja Waterstradt, Elke Hessel, Peter Müller und Klaus Peter Hofmann (2006)

„Transbilayer distribution and movement of cholesterol in the rod outer segment disc membranes“ FEBS Special Meeting. European Lipodomics Initiative, Noordwijkerhout, Niederlande

Katja Waterstradt, Elke Hessel und Klaus Peter Hofmann (2007)

„Cholesterol in rod outer segment disc membranes“ International Conference on the Bioscience of Lipids, Turku, Finnland

Katja Waterstradt, Elke Hessel und Klaus Peter Hofmann (2008)

„Role of cholesterol in the first steps of visual signal transduction“ German Biophysical Society Meeting 2008, Berlin, Deutschland

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

Katja Waterstradt

Berlin, 21. Dezember.2008